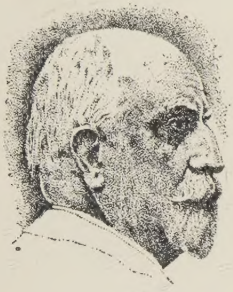
VOLUMEN 5 ENERO-JUNIO 1952 NUMS. 1-2

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
28 MAR 1960

SUMARIO

Página

CONFERENCIAS Y COMUNICACIONES

Ferrán y la Investigación, por **Arnaldo Socías** 5

La influencia del enyesado sobre la fermentación de los mostos de uva, por **Hugo Schanderl** 17

Optimo de latencia. Aportación al estudio de la toxicogénesis diftérica, por **J. Seoane Porrúa** 29

Estudios sobre la fermentación del esparto. III. La evolución del amoníaco en el proceso del enriado del esparto, por **Vicente Callao** y **Eduardo Esteban Velasco** 39

Modificación del método de G. Ramon para valorar la antitoxina diftérica, por **F. Gordón** y **A. Martínez** 53

El método del Aspergillus niger para la determinación de elementos en suelos. I. Puesta a punto del método para determinaciones de magnesio, por **Manuel Ignacio Candela Martínez** 63

INFORMACION

Profesores extranjeros en la Sociedad de Microbiólogos ... 85

Curso en el Instituto «Ferrán», de Microbiología 85

Actas de la Sociedad 86

BIBLIOGRAFIA

Anales de Medicina Pública. Vol. III. 1951..... 89

Indice de artículos de revistas. 89

SE SUPLICA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERBETEN
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
SERRANO, 113 ó 152 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 22 pesetas. Suscripción anual (4 números): 80 pesetas.

VOLUMEN 5 ENERO-JUNIO 1952 NUMS. 1-2

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

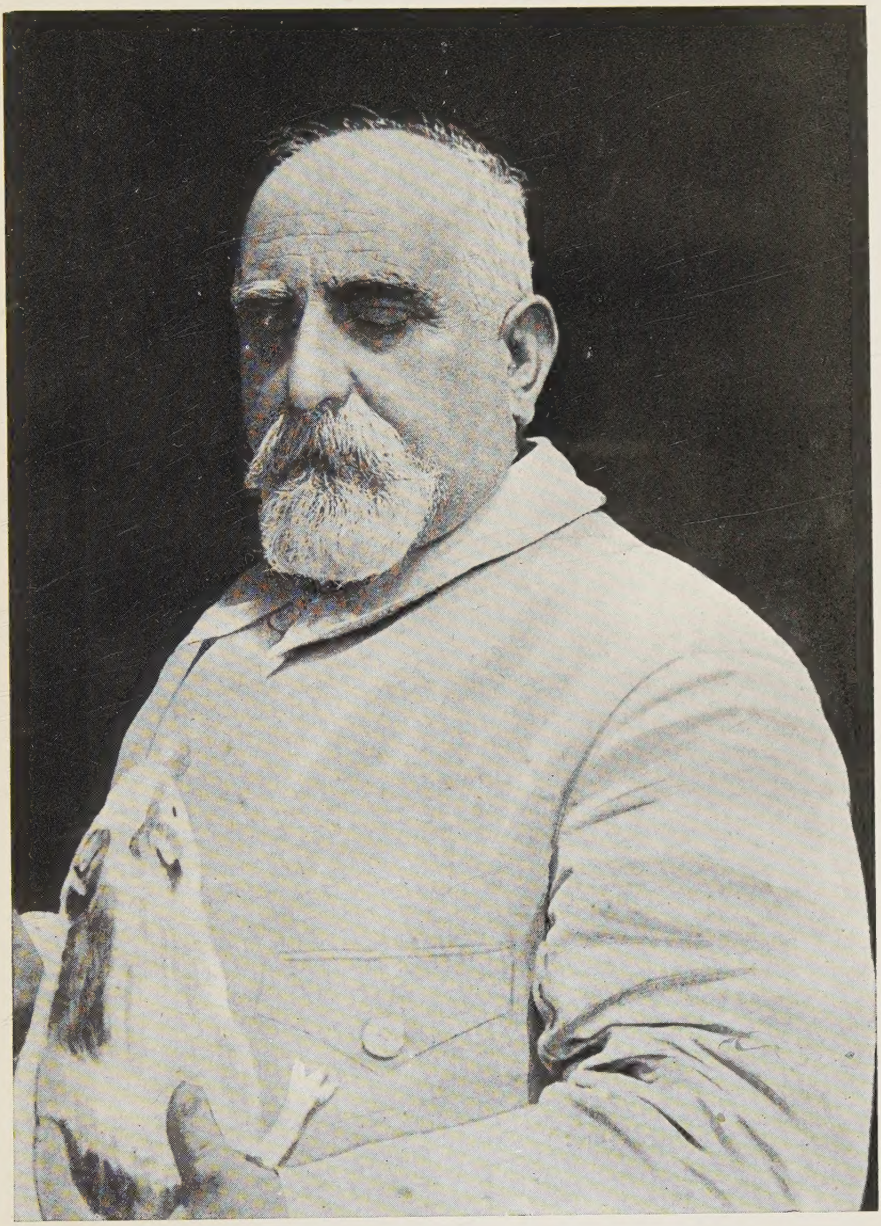
CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. don Arnaldo Socías Amorós, Director del Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología del C. S. I. C.

Prof. Dr. don Lorenzo Vilas López, Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. don Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

GRAFICAS TEJARIO, S. A. Plaza del Biombo, 4. Teléfono 22 12 88. MADRID



Jaime Ferrán y Clúa.

1852-1929

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/international-microbiology_january-june-1952_5_1-2

FERRAN Y LA INVESTIGACION

FERRAN, EL HOMBRE

Las manifestaciones de la vida de todo hombre en la naturaleza, o sea, el fenómeno viviente para su sociedad, depende siempre de los factores contenidos en su genotipo y en su fenotipo. Lo que vemos, el fenómeno del tipo, es —diríamos— la máscara que envuelve al tipo genuino. Sólo le es dado al hombre ver y tratar de comprender la fenomenología de la persona; en cuanto a lo genuino, a lo más íntimo de su ser, sólo puede ser objeto de un análisis siempre temerario, pero, por su misma naturaleza, ferviente.

Está claro, pues, que al querer explicar la trayectoria de una vida buceemos en su misma naturaleza. Ferrán era sobre todo un carácter apasionado. Hombre emotivo, despierto y activo, sus sentidos parecían no sufrir embotamiento y estaban prontos a captar realidades. A estas peculiaridades se les sumaba una poderosa imaginación ordenada y un tesón rayano en la testarudez. Era algo soñador, adivino y profeta, y como tal, de su rostro noble surgía una mirada, un raro fulgor; sus ojos parecían estar organizados, más que para recibir luz, para proyectar la propia; esto puede apreciarse bien en un retrato que le hicieron hacia los veinticinco años. Ciertas personas, cuya mirada es efluvio, tienen en ella algo demoníaco; en otras, es luz creadora, candente y viva; en todas ellas lo sustantivo es su proyección del espíritu del genio. Esta mirada es patrimonio de los hombres de gran intuición, que les nace de lo profundo del ser.

Ferrán, en una palabra, era un apasionado con poderosa personalidad de artista.

Entre las vidas de los personajes que hicieron historia, me enamoré de la de aquel hombre que conocemos por Colón, y la tengo como máximo exponente de la del investigador. Intuitivo máximo, soñador de irrealidades que se le truecan en verdades, para luego abatirse en actuaciones prosaicas. Hombre que, enamorado de la gloria, sabe conquistarla y levantar un tropel de envidias a su paso. Lo considero como el gran ejemplo del investigador científico, en sus glorias y en sus desgracias.

Cervantes, a modo de un esquizofrénico genial, dividió a la persona normal

en dos componentes: Don Quijote y Sancho. Así pudo establecer el diálogo entre dos tendencias del ser; exageró con mano maestra estas dos facetas que llevamos dentro, formando una unidad orgánica, que es el hombre. En unos predomina el hidalgo, en otros el escudero; en pocos hay equilibrio. En muchos, las vivencias de las dos personalidades están apagadas y casi no existen; en algunos son poderosas, equilibradas o no. Son los contrastes los que dan energía.

Colón, en muchos momentos, es Don Quijote, y en otros es Sancho. Me figuro que Ferrán —genio investigador— tiene algo de común con el descubridor de América, y eso nos puede explicar su vida, de la cual se podrán discutir múltiples aspectos —en una amplia concesión—, pero nadie podrá negar que fué esto: un gran investigador, fecundo en ideas y en obras. Yo no estoy conforme con que Ferrán fuese hombre de ideas y sólo de ideas, sino que plasmó realidades, y muchas de ellas fecundas; y si no tuvo la suerte de completarlas todas, fué porque la vida del hombre es limitada. Nadie duda de que Colón es el descubridor de América, a pesar de que sólo hollara una mínima parte del vasto continente. A Ferrán, para poderle dar el título de descubridor real y positivo, le basta y le sobra que fuera «el primer sabio que vacuna, con bacterias vivas y cultivadas en el laboratorio, a la humanidad enferma», porque está para siempre admitido por los cenáculos científicos del mundo civilizado que fué él quien, en 1885, por primera vez en la historia de la humanidad, vacunó en España contra el cólera, y esto lo hacía varios meses antes de que el gran Pasteur se atreviera a otro tanto con la rabia.

En otro lugar esperamos hacer el estudio de la ciencia descubierta por Ferrán; aquí es su personalidad y el medio social en que vive el objeto de nuestras preocupaciones; es su esfuerzo para remontarse contra corriente en medio de envidias e incomprensiones que, a modo de rémora, le pesan y atan. Este clima era el de la sociedad de fin de siglo en España.

En aquel medio social que fenecía, podía aún subsistir el desdoblamiento de Don Quijote y Sancho en la investigación científica. El burgués ilustrado, cuya vida estaba resuelta al comenzar la jornada, gracias a las rentas de su patrimonio o a una profesión bien remunerada, con pocas horas de trabajo obligado, podía dedicar, bajo un noble afán de cultura e ilustración, el resto del día a un trabajo muchas veces arduo y sin resultados crematísticos. Era posible, pues, una ciencia pura y unos hidalgos para cultivarla.

Así, Ferrán pudo ser, según su época, el último investigador solitario y esforzado, con la mínima libertad de una economía precaria, pero aún independiente, y superando las postrimerías de aquel modo de ser social que moría y daba paso al presente, con una pasión vocacional para la investigación.

Nuestro sabio no recibió apoyo de mecenas ni del Estado, y a pesar de

esto a él se le exigió todo sin darle nada; y aún hubo quien le tildó de mercachifle.

No es de extrañar, pues, que en el afán de ver la paja en el ojo ajeno, se le haya inculpado también de no haber creado escuela. Ferrán no era Profesor, no tenía ninguna misión encomendada y remunerada en la enseñanza. Siendo sus dificultades económicas enormes para sus trabajos de investigación, ¿cómo podía además nuestro hombre alimentar discípulos? En verdad, no recuerdo una persona a quien se le haya exigido una más absoluta negación de todo egoísmo. En una disciplina costosísima como la Bacteriología, que el mismo Cajal tiene que abandonar por demasiado cara en aparatos y en sostenimiento y, en consecuencia, dedicarse a la eremítica Histología, Ferrán se atreve a nadar contra corriente. Pero aún hay más, y es que los discípulos son un poco como las mariposas nocturnas, atraídas ciegamente por la luz que deslumbra, y a nuestro sabio se le intentó poner una pantalla que más que tal era un muro sólido y hermético: el desprestigio.

A todo lo expuesto, para dar a entender su personalidad, hay que añadir una última pincelada. Su íntimo amigo fué don Amalio Gimeno, dos veces Ministro de la Gobernación, y —¡cosa rara!— no se aprovechó de tal amistad para recibir prebendas, cargos, ni condecoraciones. Ferrán murió sin unos ni otras.

Cuando la Exposición Internacional de Barcelona, en 1929, su Majestad el Rey Don Alfonso XIII, por deseo espontáneo, quiso conocer al sabio y rendirle egregia visita en su mismo laboratorio; le dijo: «Conozco vuestro calvario del año 85 y os garantizo que no se repetirá. Quiero ser vuestro colaborador en el terreno de la eficacia. De la ciencia bacteriana nada conozco, pero considero que sois uno de los hombres dignos de ayuda y podéis contar con la mía». Estas palabras fueron pronunciadas el 27 de mayo; el 22 de noviembre, Ferrán moría.

Parece como si a ciertos hombres Dios les concediera una poderosa inteligencia, tesón, salud y una personalidad excepcional, por estar predestinados a aguantar los golpes continuados de la adversidad creada por taimados envidiosos.

Ferrán, con su carácter, tiene un gran parecido con Pasteur, pero si comparamos —aunque sea someramente— el clima que creó Francia en torno a Pasteur, frente al de España con Ferrán, bien fácil nos será comprender los frutos de uno y de otro.

Hay un libro que todo microbiólogo debiera conocer a fondo, por las enseñanzas que, en verdadero acervo, contiene; es «La vie de Pasteur», escrita por su yerno, Valery-Radot. Múltiples son las consecuencias que de su lectura pueden sacarse, no siendo las más importantes las que se refieren a una ciencia que nacía y a sus técnicas. La lección capital está en el clima que la sociedad y el Estado francés de la época imprimieron en torno al sabio. Ambiente que

no sólo no lo tuvo nunca Ferrán, sino que vivió en plena hostilidad, y ello le obligó como reacción a encerrarse en una severa introspección.

Pasteur, en su ambiente, creó una sociedad restringida de colaboradores y en ella actuó como un p a t e r f a m i l i œ, con autoridad y hasta severidad; pero, dominándolo todo, había lazos vivos de afectos y amistad; o sea, que era una casa acogedora en un clima propicio. Esto no lo pudo hacer Ferrán porque su pobreza le impidió crear su familia científica, y el ambiente le recluyó en una torre de gruesos muros.

No basta que la humanidad engendre hombres de excepción si luego la sociedad no los ha de cobijar y amparar, por una visión mezquina y suicida.

Tan importante para la civilización es el nacimiento de hombres singulares como su amoroso cuidado.

CLIMA E INVESTIGACION

Aparte de la personalidad del investigador, que, como pocas, asienta en una singular y conspicua vocación, acabamos de ver que es necesario otro gran factor que influye grandemente en el fenotipo, y es el ambiente social de la época en que vive; clima que le es dado al investigador y que bien poco puede modificar él en provecho propio.

Nuestra actual sociedad es bien distinta en cuanto a su capacidad de albergar en su seno a la investigación científica de como lo fué la del siglo XIX.

Hoy el tipo burgués a que antes hemos hecho referencia está en trance de desaparecer como especie. El factor económico ha cambiado radicalmente y no permite el «ocio fecundo»; todos nos vamos volviendo artesanos de la investigación, nos es preciso ganarnos en ella el jornal, y ¡menos mal si no acabamos en obreros asalariados! La diferencia es obvia, y no requiere explicación.

Ya no se puede hablar de una ciencia pura y otra aplicada como conceptos bien distintos. La ciencia, siendo una, tiene dos modos de presentarse en la práctica de la investigación; uno es aquel en que se plantean cuestiones cuya resolución es ardua y su fin económico lejano o imprevisible, de tal modo que, por lo regular, si éste se presenta un día, ya no suele ser en provecho de quien lo descubrió, ni para los semejantes de su generación. Otro es aquel cuyas consecuencias lucrativas acontecen en un próximo mañana. No tratamos aquí del profesional de la ciencia, no investigador, que se limita a poner en práctica lo ya descubierto.

Don Quijote y Sancho van en busca de sendas aventuras; el uno busca la gloria; el otro, las ínsulas. Ambos tienen de común que han de vivir. El caballero es un hidalgo —tiene su patrimonio—; el escudero espera su soldada.

Cuando los hijosdalgos van desapareciendo con los patrimonios, es necesario a la sociedad que, al menos, no muera su espíritu de aventura; preséntense

entonces los mecenas, y si éstos tampoco son hallados, el mecenazgo ha de ser función de Estado. Cuidémonos bien de no establecer el equívoco en torno a este término: ser mecenas implica señorío; ser patrón o capataz es otra cosa.

Para todo investigador es esencial un cierto espíritu de artista, y a la sombra de un auténtico mecenazgo aún pueden vivir con honor los artesanos; bajo la esclavitud del patrón sólo es posible un proletariado para una producción en serie. En aquel ambiente, el artista obrará como un hidalgo y podrá ir en pos de aventuras. En el otro, siempre su libertad creadora, atada por el ambiente y las circunstancias, le hará exclamar como a Sancho, luego de la aventura de los Yangüeses: «Señor, yo soy hombre pacífico, manso sosegado y sé disimular cualquier injuria, porque tengo mujer e hijos que sustentar y criar».

El investigador, primero y siempre, es un artista, y para ser tal, cuando menos, se ha de sentir con la libertad del hidalgo.

En el trance actual de nuestra civilización todo esfuerzo tiende a la lucha entre ser todos hidalgos con libertad o proletarios con esclavitud.

La actual humanidad tiene que admitir dos tipos capitales de civilización: una, tras el telón; la otra, ante él. Una, materialista y atea; la otra... O sea: una, bien definida; otra, compleja y que requiere un análisis. Esta última, que llamamos occidental en cuanto a su cultura, contiene un mundo de economía próspera, representado por Norteamérica como máximo exponente, y otro de economía débil, cuya representación se encuentra en Europa. A Norteamérica, la prosperidad le permite —por el momento— una gran libertad, y con estos dos factores surge una plétora de creación científica. A Europa —donde estamos nosotros metidos—, la vida dura le hace tender al egoísmo, y esto acontece cuando, más que nunca, los adelantos científicos son fruto de convivencia en equipo. A pesar de esto, con la civilización actual, la sociedad humana es más unidad ecuménica. Es un todo cerrado con tendencias dispares. Una de éstas queda definida según la regla capital que le rige: «Es necesario usar cualquier artimaña, treta, métodos ilegales, evasivas y disimular la verdad». (Lenin. «Obras completas», vol. XXIV, pág. 122, ed. rusa.) Esta tiene la característica de encontrarse, numérica y geográficamente, fuertemente unida y representada. La otra, en cambio, la forman islotes de fuertes individualidades con conciencia y voluntad de ser «la sal de la tierra». Envolviendo estas islas se encuentra una mayoría que es una mezcla esforzada y liberal, a la que hay que reconocer que en gran parte ansía la verdad, pero se encuentra dentro de un confusionismo laberíntico. Esta mayoría representa casi la totalidad de Occidente. Como medio ambiente para la ciencia y el espíritu, toda esclavitud determina un grave empobrecimiento y una estéril deshumanización.

En la sociedad de la mecánica, fría y técnica disciplina, todo se va ordenando como una Sociedad Anónima. En ella se puede separar un hombre de su cargo, en el que ha dejado sus mejores sudores y vigilias. Nadie es indispen-

sable. Nadie sabe cómo es, qué opina, hasta que quiere su jefe o patrón, porque éste —en el fondo— es un Consejo de Administración, cuyas responsabilidades y compromisos se reparten según las circunstancias.

La protección paterna que siente el hijo, y que es a la vez responsabilidad del padre, y se trueca en agradecimiento y veneración filial; la amistad, que al unir obliga mutuamente; estos lazos vivos y humanos que deben unir a los hombres se encuentran sustituídos por una pobre soldada y una fría relación burocrática. En este ambiente, preñado de tácitas reservas que aparentan sagacidad y prudencia, se esteriliza el criterio, la responsabilidad y, sobre todo, la entusiasta iniciativa.

Y luego, cuando la máquina no funciona porque ha perecido toda iniciativa, responsabilidad y criterio, estos factores tienen que ser sustituídos tomando medidas drásticos. Sólo éstas pueden sujetar cada hombre hecho un egoísmo; mas estas uniones de acero no son capaces de trabar un conjunto vivo. En el ambiente del egoísmo, la adulación y el servilismo son sus frutos naturales, que irán a fomentar aún más el despotismo. Entre los fríos egoísmos enhiestos siempre se encuentra, como de generación espontánea, la cauta serpiente que, sin levantar polvo, sabe contornear todos los obstáculos casi sin rozarlos, pero su mordedura es venenosa. La hipocresía —lentamente— irá cubriéndolo todo.

En este ambiente, la creación —fruto del espíritu— tiene que tener, a la larga, una existencia precaria; dentro de un tiempo —tal vez demasiado largo para esperarlo— irremisiblemente acontecerá la negación de la muerte.

La Ciencia sólo puede dar frutos ubérrimos de nueva creación cuando surge como árbol recio que se yergue por la fuerza del espíritu, y sólo a su amparo —aunque se disimule— pueden las lianas trepadoras de una pseudociencia subir, pero siempre parásitas, capaces del apoyo prestado, aunque fuese de un tronco muerto.

Porque la Ciencia es flor delicada del espíritu; del Espíritu de Verdad. Buscar con pasión y valentía las manifestaciones de la Verdad. Muchos agnósticos ignoran que en el fondo su cultura y civilización —que no es de un día— es cristiana antes y después de Cristo.

Sólo el camino estrecho, pero libre, donde reinan lazos cálidos y humanos de amistad y hermandad puede restablecer una unidad concreta espiritual en la sociedad. En los islotes de civilización occidental, donde este espíritu se defiende, los hombres se alientan en su diálogo con Dios en la soledad de la noche y en el silencio y meditación de la vigilia; sólo que al despertar al nuevo día quedan en su quehacer prendidos en la telaraña de los soberbios y exclusivos egoísmos y cunde el desaliento de todo esfuerzo, al menos en apariencia, vano.

Así es como al mediar este siglo el hombre dedicado al espíritu anhela el retorno a la naturaleza madre y siente una angustia opresora ante los monstruos que son las grandes ciudades. Mas aquél que espiritualizado puede huir

a la soledad de la naturaleza y estar en ella en armonía, pronto aprende que allí su diálogo con Dios no es paz, sino lucha, como la de Jacob y el Angel en la noche; para titanes. Entonces medimos las fuerzas y humildes retornamos a la vida entre los hombres; comprendemos que la pura realidad es que estamos en plena crisis y la lucha es esforzada, y es cobardía renunciar. Nuestro estandarte tiene por lema las palabras del Eclesiástico, IV-30: «Lucha por la verdad hasta la muerte y el Señor Dios combatirá por tí».

ARTISTA-INVESTIGADOR

Todo investigador tiene su denominador común. ¿Cuál es la entraña que determina en el carácter de un hombre su dedicación a la investigación? Yo creo que esta condición radica en lo más profundo del ser. Me atrevería a decir que no está en el genotipo ni en el fenotipo; es algo que bucea más adentro y que da su impromta a uno y otro. Está enraizado profundamente; proyecta su tallo a través de lo genérico y de lo fenoménico. Surge de la misma naturaleza espiritual del hombre, que es el d e s e o d e s e r. Estriba en la tendencia innata que siente toda persona de integrarse y de llegar a ser «persé».

Todo hombre, por ser persona, siente el deseo de ser. Lo que sucede es que hay grados y modos de sentir y tener este deseo.

El intelectual lo siente como ansia de saber, y es como Aristóteles comienza su metafísica, diciendo: «todos los hombres tienen, naturalmente, deseo de saber; tienen apetencia de saber, de sabiduría».

Lo interesante de esta definición es la apetencia, el hambre de saber, el integrarse con la sabiduría. En esta condición esencial, ¡ay de aquél que pronto se harta!; es preciso que a medida que coma sienta más las ganas de comer. Al comer sabiduría, ésta, más que de comida, le ha de servir de aperitivo.

Más que la admiración por las cosas, más que el asombro de las cosas, es la apetencia, es el amor de profundizar en ellas lo que hace ser investigador. Este querer es de una gran exclusividad, y a esto se debe que el intelectual dedicado a la investigación tiende siempre a la distracción por ensimismamiento; le basta su querer, y ésta es su suerte y su desgracia.

La primera manifestación del niño cuando ya sabe balbucear en la lengua de sus padres es siempre la p r e g u n t a. De la misma manera que continuamente está hambreando por la comida para su cuerpo en plena integración, así siente también el ansia de conocer. Resulta también aquí ser la verdad la sentencia de Jesús: «si no os mudáreis e hiciéreis como niños, no entraréis en el Reino de los Cielos» (San Mateo, XVIII-3). O sea, que el investigador ha de preguntar con la humildad del que no sabe, constante e insistentemente, hasta ser pesado. Quien, por desgana, por apocamiento o por soberbia, no pregunte, no podrá caminar por los senderos de la investigación.

Es preceptivo, pues, el preguntar, pero para recibir contestación es condición que la pregunta que se formule pueda ser contestada. La pregunta que el investigador debe hacer a las criaturas, más que el ¿por qué?, debe ser el ¿cómo?, ya que a lo primero pocas veces se nos podrá contestar y sí, en cambio, a lo segundo.

El hombre, investigador científico, por su propia personalidad ha de tener en alto grado ansia de saber el cómo de las cosas. Y en vez de hartarse con su integración le han de estimular su apetencia. Apetito que no sólo debe mantenerse, sino que superarse en la cualidad; debe preferir lo que nadie tocó ni probó. Esta es la misma entraña del artista: el que es capaz de ver y exponer lo que Dios creó y aún está velado para la mayoría de los hombres.

Investigador significa, pues, ser hombre-niño capaz de preguntar a la creación con avidez selecta por el cómo de su ser.

Nos interesa ver cómo esta premisa se encuentra largamente concedida al carácter de Ferrán, y, claro está, nuestro análisis no ha de ser en sus pesquisas científicas en el campo de la microbiología, sino antes, cuando, como el águila, va tomando altura, dando vueltas para luego lanzarse en una dirección.

Cuando Ferrán era un buen estudiante de medicina en los vetustos claustros del Hospital de la Santa Cruz de Barcelona, salas repletas de miseria bajo bellas bóvedas góticas, es, además de aprendiz de medicina, un estudiante de la pintura y de la escultura en los talleres de Santigosa y de Marqués. Con éstos aprende a amasar el barro y a dar vida al yeso. Entre sus múltiples obras de aquella época se conservan especialmente dos magníficas esculturas llenas de gracia y carácter: son dos terracotas, una de su novia y la otra de su esposa. Ambas son dignas del título de escultor.

El busto de la hermosa muchacha que fué la novia de Ferrán, de una belleza singular, recuerda en otro sentido el temperamento de nuestro hombre. La joven murió víctima de la fiebre tifoidea. Parece ser que esta muerte orientó el camino del futuro bacteriólogo; el artista romántico se prometió a sí mismo luchar sin descanso contra aquella enfermedad infecciosa, y a fe que lo consiguió.

Luego, ya Médico, no es sólo esto, sino que desde un principio, y antes de ser bacteriólogo, es algo más. Su descanso y diversión es un tipo de investigación muy de la época. Sus biógrafos ya nos dan extensa reseña sobre ello.

«Incapaz por temperamento de asistir a las tertulias de casino y de café, y poco inclinado a las diversiones, distrae sus ocios en el estudio de la electrotécnica y en el cultivo de la fotografía, del dibujo y de la pintura, tomando tal afición al arte, que, en cierta ocasión, hablando con el notable Astrónomo don José Landerer, cuyo retrato acababa de terminar, le dijo: «Desengáñese usted; he errado la vocación; yo nací para el arte.»

«En el campo de la fotografía—dicen sus biógrafos Ripoll Noble y Gras Artero—comienza a actuar como aficionado y muy pronto no sólo la domina, sino que en su inteligencia privilegiada el genio se manifiesta; no se limita a aceptar las cosas existentes, sino que las corrige, las enmienda y, después de investigarlas, descubre nuevos hechos.»

Aquí podríamos decir que el artista dejó su arte por la investigación, y no es eso. El artista lo es en todo aquello que toca. En su vida será artista de la escultura y pintura, de la fotografía y de la bacteriología. Es su modo de ser.

Sigamos.

Tropezando en la realización de las microfotografías con el grave inconveniente que causa el grano del vidrio deslustrado para enfocar finos detalles, lo resuelve mediante un dispositivo que hace que el citado vidrio tenga un movimiento pendular mientras se enfoca.

En 1879 publica, en colaboración con I. Paüli, un folleto titulado «La instantaneidad en Fotografía», en el que detalla el procedimiento de la emulsión de bromuro de plata con gelatina, «diez veces más rápido que el colodión húmedo», y así, con la modesta sencillez del sabio, lanza al mundo un invento con el que habían de lucrarse muchos.

Ocho años más tarde se le ocurre la misma idea a Audra, de París, y poco más tarde, la casa Young, de Alemania, toma patente para preparar emulsiones fotográficas, siguiendo las ideas de Ferrán. Por otra parte, la casa Kodak, de Norteamérica, preparaba su material fotográfico con arreglo a la misma técnica. Pleitea la casa Young con la Kodak y pierde el pleito, pues la empresa norteamericana pudo demostrar que se trataba de un descubrimiento perteneciente ya al dominio público, y que la casa Young no había patentado ningún método original y propio, supuesto que, como se demostraba en el folleto a que anteriormente hemos aludido, a Ferrán correspondía, de un modo indiscutible, la primacía; y el descubrimiento no había nacido ni en Alemania ni en los Estados Unidos, sino en las riberas del río ibero.

Otro invento suyo es la fórmula de emulsión pigmentaria inalterable, que constituye una de las más importantes del moderno arte fotográfico. Es lo que en la actualidad se conoce con los nombres de métodos al carbón, a óleo, a las tintas grasas, a la fotoglitia, etc.

La técnica de estos diversos procedimientos, descrita en las revistas y libros del arte fotográfico, está llena de pequeñas dificultades que sólo han logrado vencer los más hábiles, no sin haber tenido que atravesar un difícil aprendizaje, motivo que ha dificultado la generalización de tales métodos. Ofrecía, por consiguiente, un interés de primer orden cualquier descubrimiento que, suprimiendo dichas dificultades, pusiese en manos de todos lo que seguía siendo patrimonio exclusivo de los muy hábiles.

Estas preciadas ventajas las ofrecía el pigmento coloidal ideado por Ferrán. Consistía en una emulsión de materias colorantes en una o varias de las indicadas substancias coloides.

Esta emulsión se conservaba indefinidamente, y extendida sobre un soporte de papel, estando previamente sensibilizado por un bicromato alcalino, daba fotografías de una rara perfección.

En colaboración con Pauli, publica Ferrán en «Crónica Científica», varios trabajos sobre electrotécnica.

Entre ellos destacaba el estudio del microteléfono, idea recogida años más tarde por Bonzo.

En 1878, con aparatos construídos por él mismo, realizó una comunicación telefónica entre Tarragona y Tortosa (84 kilómetros), la mayor distancia alcanzada en aquellos tiempos.

Amigo íntimo del Astrónomo y Biólogo valanciano José Joaquín Landerer y asiduo concurrente al laboratorio y a la biblioteca de éste, encuentra allí los «Comptes rendus» de la Academia de Ciencias de París, donde Landerer publicaba por aquel entonces sus trabajos sobre el planeta Júpiter y sus satélites. Esta va a ser la causa de un nuevo rumbo en su vida, ya que es en tal revista donde se entera de las comunicaciones de Pasteur» y le nace la afición a los estudios de microbiología, adivinando desde el primer momento la revolución que se iniciaba en el campo de las ciencias biológicas. Con este motivo usa el microscopio petrográfico que Landerer tenía para el estudio de las rocas y poco tiempo después encarga un modelo Nachet a París para sus estudios de microbiología.

Ya Ferrán está consagrado a la investigación experimental de la bacteriología, y entonces se construye aparatos inventados o modificados por él: estufas de cultivo, matraces, redomas, etc. Dice Landerer, refiriéndose a este punto: «para las necesidades de su técnica le he visto improvisar aparatos con los medios más rudimentarios».

Después de esto comienzan los tiempos en que Ferrán va a ser un auténtico descubridor en la microbiología.

Creemos que con estos datos, y sin dificultad, podemos conceder la cualidad de artista a nuestro sabio.

Esta cualidad que nosotros consideramos capital para llegar a ser un investigador, es también considerada como tal por W. I. B. Beverige, quien afirma que la investigación, más que una ciencia, es un arte, y sobre este aspecto basa las características del modo de enseñar a los aprendices; dice que es preciso encomendarla a investigadores de larga experiencia personal que por encima de la misma ciencia pongan interés en cultivar el gusto y el estímulo.

Muchas veces se nos ha ocurrido que es una lástima que en las comunicaciones científicas no se explique la historia del proceso que en la mente

del investigador se ha ido hilvanando desde el mismo enfoque del problema hasta la culminación del descubrimiento. Esta misma idea encontramos en el citado autor, quien asegura que lo interesante, para el caso, más que su contenido científico lo son los métodos y andamiajes que el pensamiento del sabio ha ido elaborando para llegar al fin. Para nosotros es, pues, de sumo interés el mismo modo de vivir del sabio, su modo de ser, sus virtudes y miserias, sus apetencias y desvíos, etc.; de aquí el gran valor de las biografías sinceras sobre estos hombres.

Cada artista tiene su estilo propio y yerra, por tanto, quien quiera imponer moldes de investigador a modos de ser distintos. Hay que pedir unas pocas virtudes como común denominador; luego, dejar que obre la libertad. Es intrínseco en la naturaleza del artista la autenticidad, y si no la tiene, queda reducido a un mero copista que es incapaz de darnos una nueva visión de las cosas; no creerá —según el lenguaje que con más frecuencia se usa para calificar lo auténtico—.

Esta breve y parca pincelada de la personalidad artística de Ferrán puede tener como colofón unas letras del Profesor E. Roux, Director que fué del Instituto Pasteur de París, sabio investigador de categoría internacional:

«Recibí las fotografías que me transmitió y sinceramente le digo que son admirables y muy superiores a todos los retratos que me han hecho Edelfeld y recientemente Zo. Nunca hubiera creído que la fotografía diese una impresión tal de los caracteres fisonómicos. Comprendo por qué es usted tan cuidadoso de la pose y de la iluminación. ¡Es usted un gran artista!»

Por todo lo expuesto y cuando los personajes del drama yacen en el silencio del Universo, no podemos permitir que la ingratitud que acompañó toda la vida al sabio le siga en la muerte. Es deber de todo microbiólogo español que se dedica a investigar y hasta de todo investigador en general, conocer la vida, ideas y obras de Ferrán, para de ellas sacar magistrales enseñanzas. Y los que las consideren acertadas, también por deber, deben cultivarlas y por egoísmo amamantarse de ellas porque son de un caudal fecundo, para con su luz trabajar sin descanso. España, tan yerma de figuras científicas conocidas, debe orear las auténticas y darlas a conocer al extranjero; con ello sólo se hará justicia y Patria. De Ferrán dijo el Profesor argentino Avelino Gutiérrez que «es la figura más interesante en la Bacteriología, después de Pasteur».

Ferrán, hombre-niño de gusto exquisito, combatió tenaz hasta su muerte; y si no pudo crear escuelas y discípulos que le defiendan, Dios se encargará de que de la lectura de sus escritos surjan éstos espontáneamente, y su ciencia sea conocida en España. A la postre será fecundo.

Arnaldo Socías.

J. FERRAN y **J. PAULI.**—La instantaneidad de la fotografía.
E. GARCIA DEL REAL.—Jaime Ferrán. M. Aguilar, editor. Madrid.
JUAN PAULIS.—Ferrán. Librería Catalonia. Barcelona.
W. I. B. BEVERIDGE.—1951. Teaching the Art of Research. «Research».

BOTANISCHES INSTITUT DER HESSISCHEN LEHR= UND FORSCHUNGSANSTALT FÜR WEIN=, OBST= UND GARTENBAU. GEISENHEIM AM RHEIN. (ALEMANIA.)

LA INFLUENCIA DEL ENYESADO SOBRE LA FERMENTACION DE LOS MOSTOS DE UVA

por
Hugo Schanderl.

El enyesado es una práctica muy antigua en la elaboración de los vinos en los países que bordean el Mediterráneo.

El iniciador de la Enología española, Prof. Juan Marcilla Arrazola, en su gran obra «Tratado práctico de Viticultura y Enología española», en el tomo II (Enología), página 87, escribe: «El conocimiento del modo cómo actúa el yeso sobre los mostos durante la fermentación no es todavía completo, pero se poseen ideas más exactas que las que se admitían como probables o como ciertas hace pocos años».

Marcilla tiene completa razón cuando indica que nuestros conocimientos acerca de la acción del yeso sobre el vino todavía son incompletos. Hasta ahora se conocían las reacciones químicas, pero no las microbiológicas.

Las reacciones químicas del yeso sobre el vino se pueden representar por las siguientes ecuaciones gráficas:

I) $CaSO_4 + 2KHC_4H_4O_6 \longrightarrow CaC_4H_4O_6 + H_2C_4H_4O_6 + K_2SO_4$

II) $2CaSO_4 + 2KHC_4H_4O_6 \longrightarrow 2CaC_4H_4O_6 + K_2SO_4 + H_2SO_4$

III) $H_2SO_4 + 2KHC_4H_4O_6 \longrightarrow K_2SO_4 + 2H_2C_4H_4O_6$

Las tres ecuaciones muestran que con la adición del yeso reacciona especialmente el tartrato ácido de potasio (antes llamado bitartrato de potasio) del vino. De las tres moléculas de sulfato cálcico se forman tres moléculas de ácido tártrico libre y una molécula de ácido sulfúrico que queda en el vino, mientras que tres moléculas de tartrato cálcico se depositan en forma cristalina.

Con estas reacciones aumenta el contenido total de ácido y la concentración de H libre, lo que, indudablemente, es una mejora para los vinos del Mediterráneo, ya que con frecuencia son pobres en ácido. El aumento de H libre, que es determinable ionométricamente, y que se hace patente por la disminución de la cifra de pH, actúa, en el orden microbiológico, retrasando la evolución de las bacterias sensibles al ácido.

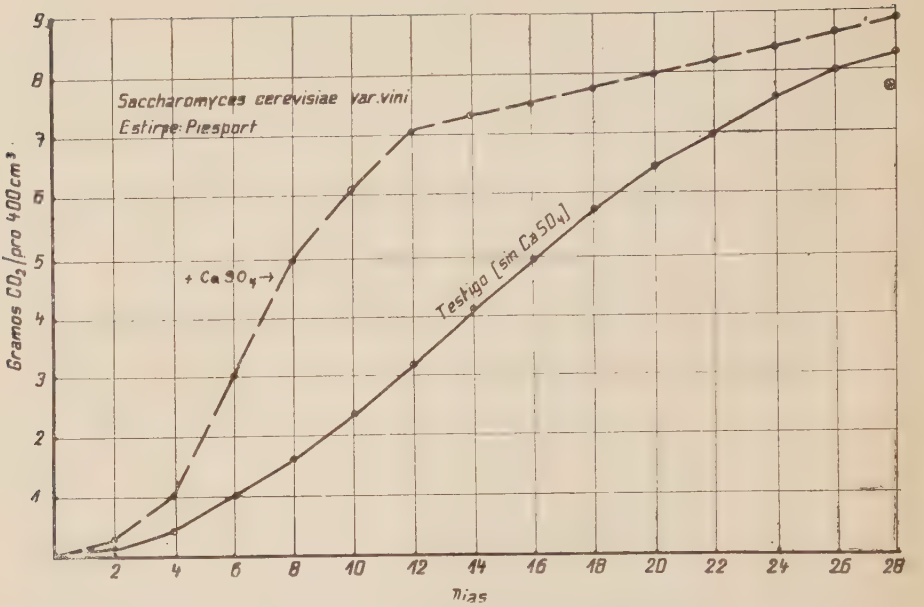


Figura 1.—Gráfico de la marcha de la fermentación con la levadura Piesport en solución sintética con y sin $CaSO_4$ (según cifras de Schander, 1904).

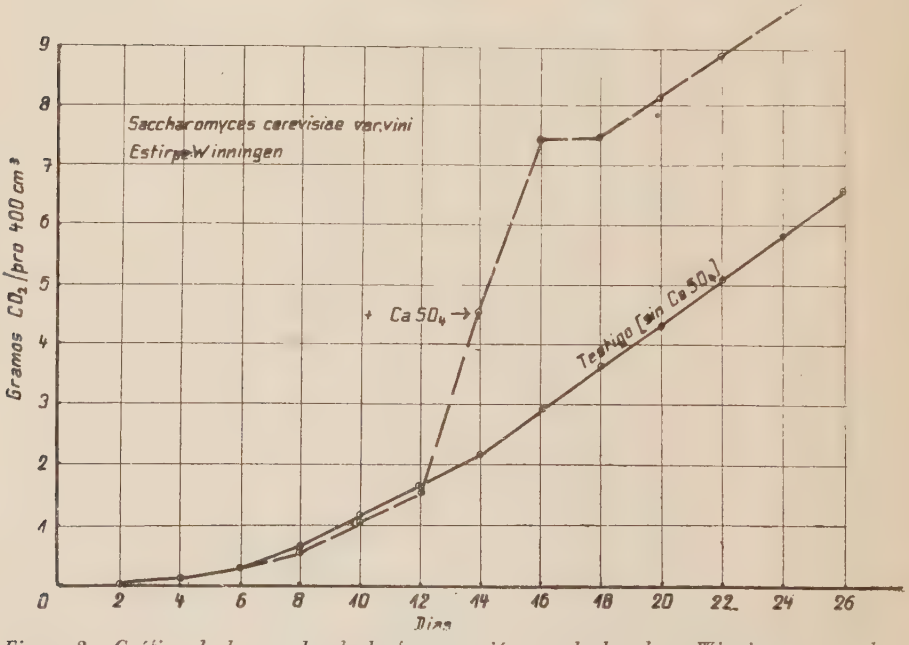


Figura 2.—Gráfico de la marcha de la fermentación con la levadura Winningen, en solución sintética con y sin $CaSO_4$.

Fisiológicamente, se sabe que los mostos enyesados terminan su fermentación antes que los no enyesados. Esto ya fué observado por Andonaud, en 1887 (citado por Sannino: «Tratado de Enología». Buenos Aires, 1948).

Hasta aquí alcanzaban nuestros conocimientos. Pero que éstos no bastan, y que son necesarias nuevas investigaciones, lo indicó Marcilla con las siguientes palabras: «En todas estas cuestiones existe un amplio campo para ensayos e investigaciones de gran importancia teórica y práctica («Enòlogía, tercera edición, página 87).

En 1904, R. Schander, en Geisenheim, estudió los mostos con y sin adición de sulfatos, encontrando, sin dar importancia de cuál fermento se trataba, que con el sulfato la fermentación era acelerada (figs. 1 y 2).

Nosotros, en 1951, estudiamos nuevamente la acción del sulfato sobre la fermentación de los mostos, y pudimos comprobar las indicaciones de Schander, obteniendo los mismos resultados con el empleo de $MgSO_4$, K_2SO_4 Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$, $FeSO_4$ o $CaSO_4$ (figs. 3 y 4). También pudimos verificar lo dicho por Schander de que después de añadir solución acuosa de acetato de plomo como indicador de las fermentaciones de Nessler, tan pronto como aparecía H_2S se formaba sulfuro de plomo negro. De esta manera se podía fijar el tiempo y se hacía visible la intensidad de formación del H_2S.

Al mezclar con $FeSO_4$, obtuvimos un depósito gris negro de levadura, que contenía FeS intracelularmente unido. La aparición de H_2S y sulfuro demuestra que los sulfatos son reducidos por la levadura.

Nosotros nos interesamos acerca de si aparecía H_2SO_3 como producto intermediario después de que nuestro alumno Slobodan Filipovic (investigaciones no publicadas todavía) encontró que la levadura de vino reducía fácilmente el tiosulfato, y que como productos intermediarios se formaban ácido sulfuroso y sulfuros.

Para nuestros ensayos preparamos fermentos sintéticos con soluciones de Lindner de la siguiente composición:

Un litro de agua común; 5 g. de fosfato monopotásico; 5 g. de sulfato de amonio; 150 g. de sacarosa y rastros de bios en forma de extracto de levadura.

Cantidades de 250 c. c. del preparado se introdujeron en matraces de 500 c. c.; a cada matraz se añadió 0,5 g. de un sulfato, y fué esterilizado sucesivamente, dos veces por vapor. Dos matraces quedaron sin SO_4.

Después de la esterilización, de cada matraz se extrajo una prueba, en la que fué examinada iodométricamente la presencia de H_2SO_3.

A continuación, cada preparado fué sembrado con una solución de células de la variedad de levaduras Geisenheim 1933.

La fermentación alcanzaba su máximo después de dos días. Al tercero

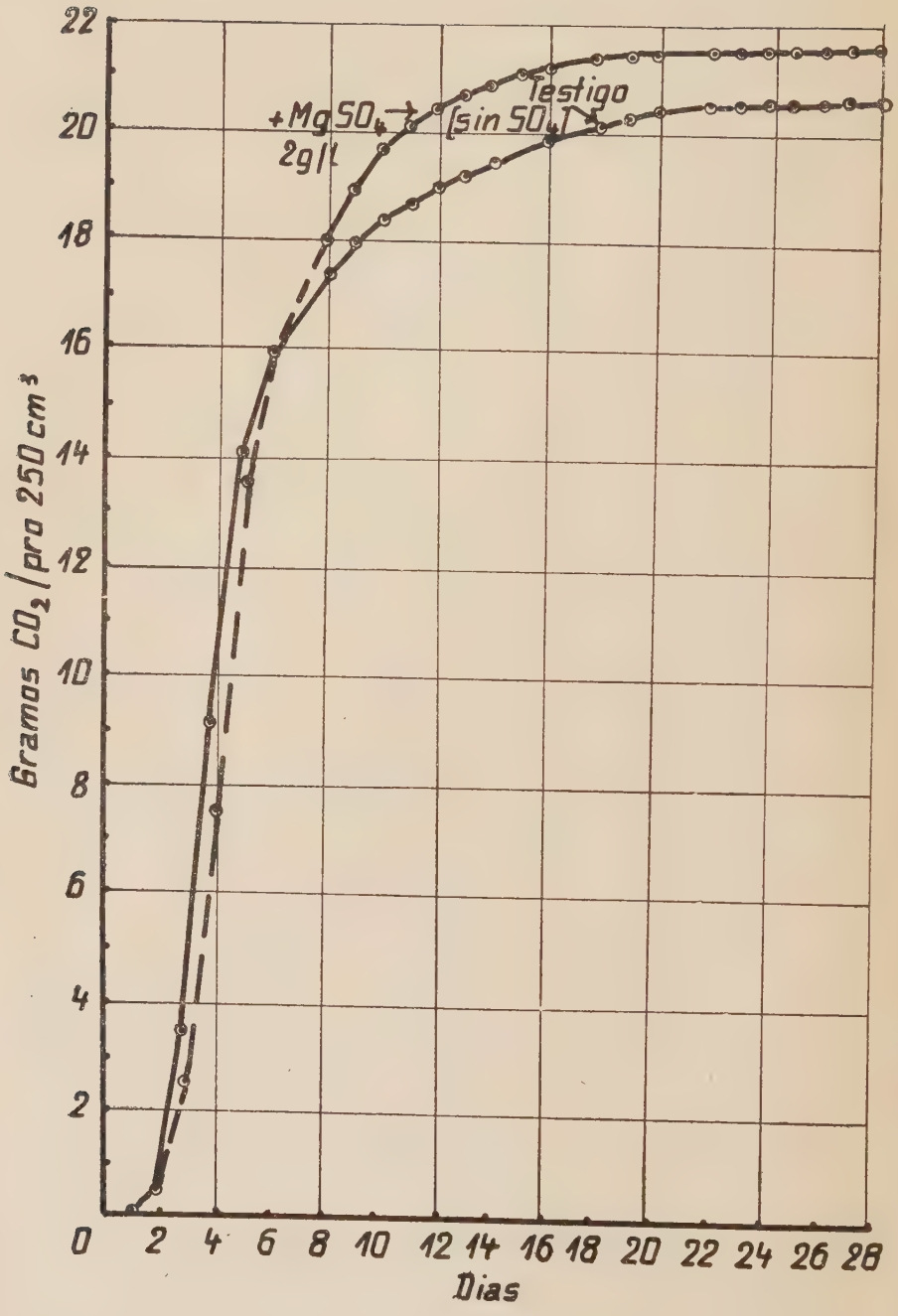


Figura 3.—Gráfico de la marcha de la fermentación en mosto de uva con y sin $MgSO_4$.

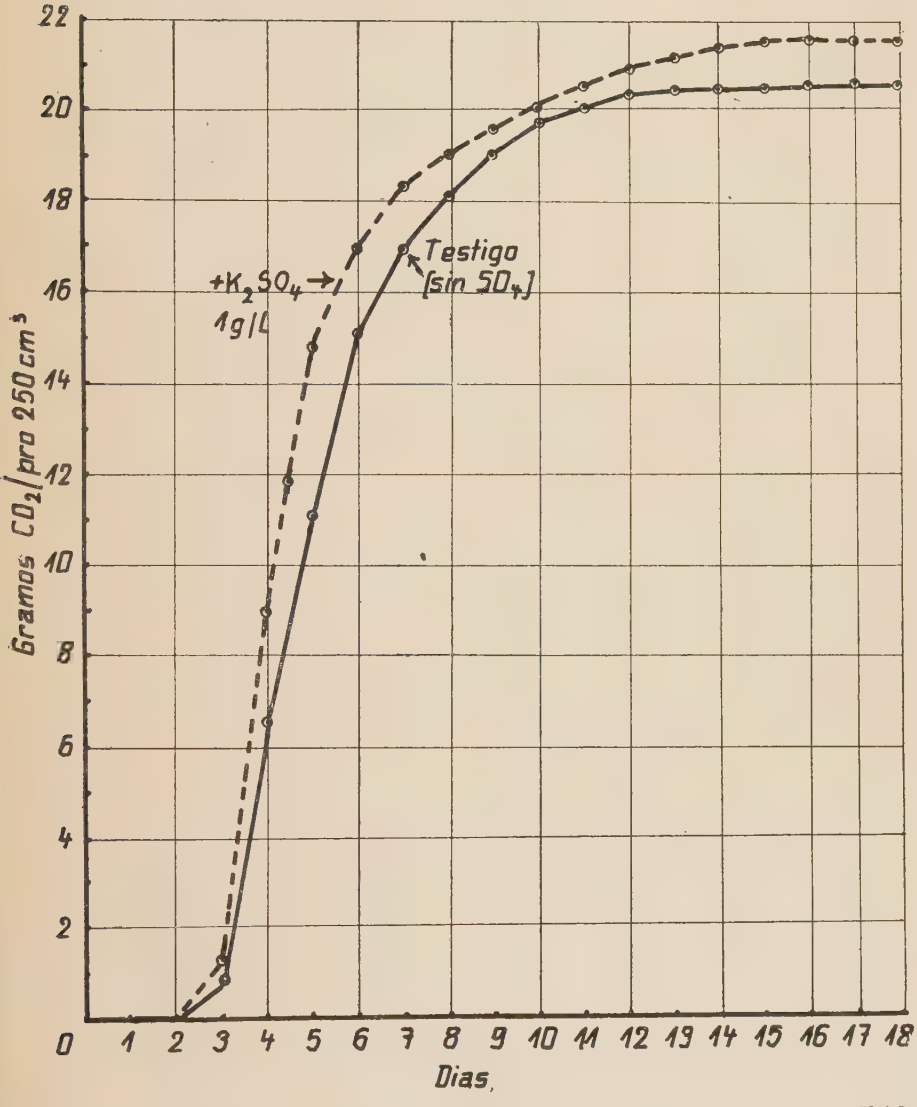


Figura 4.—Gráfico de la marcha de la fermentación en mosto de uva con y sin K_2SO_4.

y al sexto día después de la siembra se extrajeron pruebas, en las que de nuevo fué investigado iodométricamente el H_2SO_3.

Los resultados obtenidos están representados en el cuadro número 1.

CUADRO 1

CONSUMO EN C. C. DE SOL. DE YODO $\frac{n}{64}$ POR 50 C. C.

	Valor inicial	Después de tres días	Después de seis días
Solución normal de 1 Lindner	0,6	4,6	6,5
Solución normal de 2 Lindner	0,6	5,9	8,5
+ 2 g. $(NH_4)_2SO_3$/l.	0,6	6,8	11,7
+ 2 g. Na_2SO_4/l.	0,7	11,7	16,0
+ 2 g. $MgSO_4$/l.	0,5	7,0	10,1
+ 2 g. K_2SO_4/l.	1,1	5,0	6,8
+ 2 g. Ca SO_4/l.	0,8	5,5	7,5
+ 2 g. $FeSO_4$/I.	0,9	4,4	8,0

El experimento representado en el cuadro 1 sólo nos dice que durante la fermentación se formaron substancias ávidas de yodo, ya que el consumo de éste aumentó en todos los matraces. También en los dos matraces de control aumentó, ya que, a causa de un error, se les había puesto solución de Lindner con sulfato, en vez de solución sin sulfato.

El preparado con $MgSO_4$ se trató también según el método de destilación de vapor de agua de Weinmann, para medir el contenido de H_2SO_3 («Revista de Investigaciones Alimenticias», tomo 87, página 49, 1944). Este método permite aislar el ácido sulfuroso de las otras combinaciones que fija el yodo. El principio del método de destilación de Weinmann consiste en que el ácido sulfuroso es desalojado al añadir un ácido más fuerte (25 por 100 de H_3PO_4 y vapor de agua). En cuanto a la técnica, es la siguiente: sobre un matraz de destilación con 25 c. c. de agua y 15 c. c. de H_3PO_4 al 25 por 100 se coloca un embudo regulable con el líquido a examinar. Durante la ebullición se deja gotear el líquido en el matraz. El destilado es recogido en 25 c. c. de NaOH 1/N y 25 c. c. de agua. Se destilan 130 c. c. A continuación se titula el H_2SO_3 del destilado en presencia de H_2SO_4 y una solución de almidón con yodo N/64.

El método de destilación del ácido sulfuroso, según Weinmann, fué creado para la investigación del SO_2 en los llamados «Submoste» (zumos dulces, no fermentados). Al destilar mostos en fermentación o fermentados destilan también otras substancias que se combinan con el yodo; probablemente aldehido acético, que se originó en la fermentación alcohólica.

Por eso también los resultados del método Weinmann en soluciones en fermentación son más altos. Por ello, es necesario destilar también los testigos (sin sulfato) y restar estos resultados de los de la destilación de las fermentaciones con sulfato añadido. La diferencia representa las cantidades verdaderas de ácido sulfuroso producido por la levadura.

El reconocimiento del ácido sulfuroso por el método de Weinmann en el matraz con $MgSO_4$, después de seis días, dió como resultado una formación de 55 mg. de ácido sulfuroso por litro. En la investigación normal, como la hace el químico vinícola para el reconocimiento del contenido de SO_2 en el vino, en presencia de otras substancias resistentes al yodo, se obtuvo un valor mucho más alto: 101 mg. de H_2SO_3/l.

Estos experimentos ya nos dieron el firme testimonio de que durante la reducción de los sulfatos por las levaduras se desarrolla como producto intermediario el H_2SO_3.

Mediante nuevos experimentos pudimos verificar el resultado.

En otra serie de investigaciones, para la levadura, se usó una solución nutritiva sintética completamente falta de sulfato. Las cantidades de sulfato añadidas lo fueron de tal manera que en cada matraz hubiera igual número de iones SO_4, es decir, 0,8 g./l.

Los resultados iodométricos están representados en el cuadro 2.

CUADRO 2

CONSUMO EN C. C. DE SOL. DE YODO $\frac{n}{64}$ POR 50 C. C.

	Valor inicial	Días después de la siembra					
		2	5	13	16	20	58
Testigo núm. 1	0,9	2,9	3,2	3,1	3,1	2,8	1,5
Testigo núm. 2	1,2	3,8	4,4	4,0	4,0	4,0	1,9
$(NH_4)_2SO_4$	1,0	3,3	4,9	4,6	5,2	4,6	2,4
Na_2SO_4	1,2	3,7	6,7	6,7	7,4	6,6	3,9
K_2SO_4	1,3	4,8	9,0	10,1	10,2	10,2	6,1
$Mg\ SO_4$	1,6	5,7	7,8	7,8	7,2	6,8	3,0
$Ca\ SO_4$	1,9	5,5	7,4	6,2	6,5	6,5	2,8

Como muestra el cuadro 2, el coeficiente de substancias iodadas subió en los dos testigos durante el máximo de la fermentación.

Los resultados comparados obtenidos por el método de destilación de Weinmann demuestran que las diferencias entre los valores de los ensayos con sulfato y el del testigo número 2 representan el coeficiente del ácido sulfuroso.

P. e., en el experimento con K_2SO_4 se habían formado 62 mg. de ácido sulfuroso durante la fermentación de la levadura.

En una tercera serie de experimentos se investigó la capacidad de dos variedades de levaduras respecto a la reducción de sulfatos: un representante de la especie Saccharomyces y un representante de las llamadas levaduras apiculadas de la especie Kloeckeraspora Niehaus.

CUADRO 3

CONSUMO EN C. C. DE SOL. DE YODO $\frac{n}{64}$ POR 50 C. C.

a) Saccharomyces.

	Valor inicial	Días después de la siembra.				
		3	7	11	18	68
Testigo sin SO_4	0,2	2,2	4,0	3,3	0,7	0,4
K_2SO_4	0,3	3,4	6,0	5,6	6,9	2,0
$MgSO_4$	0,3	3,0	5,2	3,7	2,6	—
Na_2SO_4	0,3	2,7	5,5	5,0	6,3	2,7
$(NH_4)_2SO_4$	0,3	3,3	6,4	5,8	5,8	5,3
b) Levadura apiculada.						
Testigo sin SO_4	0,2	0,2	0,3	0,3	1,4	2,3
K_2SO_4	0,2	0,2	0,3	3,6	2,2	2,0
$MgSO_4$	0,3	0,3	0,3	2,2	5,9	4,8
Na_2SO_4	0,3	0,3	0,3	0,4	4,7	4,1
$(NH_4)_2SO_4$	0,3	0,3	0,3	0,5	0,7	5,0

Como resulta de los coeficientes del cuadro 3, también la levadura apiculada es capaz de reducir el sulfato y de formar como producto intermediario el H_2SO_3. Sólo que las levaduras apiculadas fermentan más débilmente, y por ello la producción de H_2S y la presencia de H_2SO_3 es mucho más lenta que con las levaduras de la especie Saccharomyces. De las diferencias entre el consumo de yodo del testigo y el del experimento con sulfato, deducimos que durante la fermentación se forma hasta 36 mg./l. de H_2SO_3.

Como final se realizó una cuarta serie de experimentos con mosto de uva al natural, que contenía alrededor de un 10 por 100 de azúcar.

Se añadieron tres sulfatos diferentes y una levadura cultivada de vino (raza Blankenhornsberg). La cantidad de ácido sulfuroso se investigó por el método de destilación de vapor de agua de Weinmann. Por lo tanto, en el cuadro 4 representamos los valores de H_2SO_3 directamente en mg./l.

CUADRO 4

MG. DE H_2SO_3 POR LITRO

	Valor inicial	Durante la fermentación tumultuosa	Al final de la fermentación
2 g./l. $MgSO_4$	4	11	11
2 g./l. $MgSO_4$	5	14	13
2 g./l. K_2SO_4	5	14	10
2 g./l. K_2SO_4	5	15	13
2 g./l. $CaSO_4$	4	20	12
2 g./l. $CaSO_4$	5	16	18

Si se resta el valor inicial durante la fermentación se forman 16 mg. de H_2SO_3. Si se hubiese usado un mosto con más azúcar, los valores del H_2SO_3 habrían sido también más altos.

La formación del H_2SO_3 como producto intermedio durante la reducción de los sulfatos por las levaduras del vino está comprobada tanto cualitativa como cuantitativamente en estos experimentos. H_2SO_3 es un producto de reducción. Por tanto, durante la fermentación, los sulfatos consumidos por la levadura son reducidos, y como producto intermedio se forma H_2SO_3; éste tiene que hacerse presente en el valor rH durante la medición redox.

Para este objeto se añadieron a sendos mostos de uva dos gramos de K_2SO_4, Na_2SO_4 y levadura cultivada. De cuando en cuando con el ionómetro

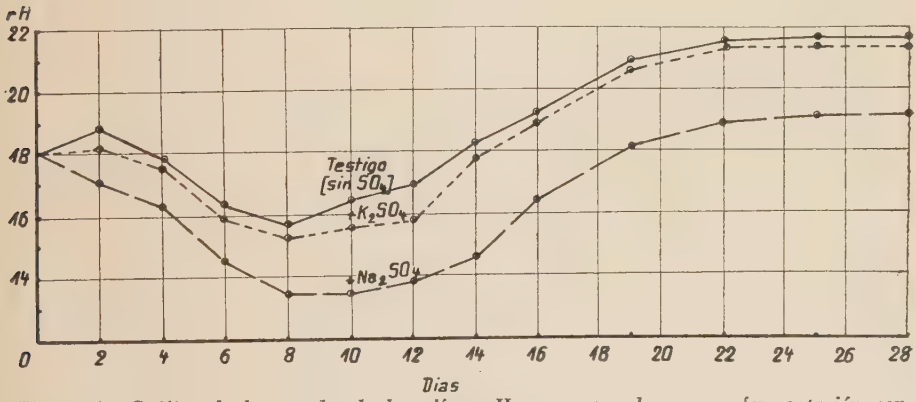


Figura 5.—Gráfico de la marcha de las cifras rH en mostos de uva en fermentación con y sin sulfatos.

de Lautenschläger (platino y electrodo de calomel) se midieron los valores rH, que se encuentran representados en la figura 5.

Examinando las curvas resultantes se ve claramente que los mostos que contenían SO_4 fueron mucho más reductores que el mosto sin adición de sulfato.

Con esto, gracias al estudio del potencial reductor, queda demostrado que durante la fermentación de mostos de uva sulfatados se forma una substancia de alto valor reductor; dicha substancia es el H_2SO_3 en estado naciente.

DISCUSION DE LOS RESULTADOS Y APLICACIONES PRACTICAS

El uso de enyesar los orujos desde tiempos antiguos en los países vinícolas del Mediterráneo lo comprendemos ahora.

Los vitivinicultores, antiguamente, sin saberlo, emplearon la fuerza reductora de la levadura, obteniendo así el H_2SO_3 a partir del yeso. Y esto, en tiempos en los que se ignoraba completamente la existencia de tal compuesto.

Ahora podemos comprender también la tan discutida acción del yeso sobre la fermentación y el desarrollo de los vinos.

Marcilla, en su «Enología», subrayó las siguientes ventajas del enyesado:

1) Hacer más difíciles y completas las fermentaciones de los mostos muy dulces y poco ácidos, en los que se descuidó o se prescindió de la sulfitación (véase capítulo VII, adición de gas sulfuroso) y de la corrección de acidez.

2) Procurar para los vinos tintos un color muy intenso y estable y para los blancos una mayor brillantez.

3) Lograr que los vinos nuevos se «despojen» y se aclaren más rápidamente.

4) Hacer posible la conservación de los vinos, contribuyendo a prevenir su alteración, en los casos de elaboraciones defectuosas.

Estas cuatro ventajas del enyesado no pueden ser ocasionadas sólo por la formación de ácido en el vino y por el aumento de iones H. Las ventajas que subraya Marcilla tienen por causa principal la aparición de H_2SO_3 en estado naciente.

Si los vinos tintos obtienen un color más intenso y los blancos una mayor brillantez, la causa es la mayor fuerza reductora de los vinos por el H_2SO_3.

Si la levadura durante la fermentación disminuye el valor rH de los mostos o vinos por la formación de iones SO_2 o SO_3, se pone en peligro el desarrollo de los microbios aerobios, especialmente de las bacterias acéticas, cuya acción es perjudicada. La consecuencia es una mejor evolución de los vinos. En países cálidos, y en la preparación del vino tinto especialmente, las bacterias acéticas son poco deseables, por ser enemigos peligrosos de la levadura.

Los trabajos de mi alumno Filipovic (en prensa) demuestran que la levadura es capaz de reducir también los tiosulfatos, bisulfitos, sulfitos y selenitos.

En la reducción del tiosulfato también se forma como producto intermediario el ácido sulfuroso.

Por tanto, la fuerza reductora de la levadura es mucho más potente que lo que antes se suponía.

RESUMEN

1) Se demuestra que la levadura del vino es capaz de reducir los sulfatos añadidos, dando como producto intermedio iones SO_3, y como producto final H_2S y sulfitos.

2) Los productos intermedios de la reducción de los sulfatos, iones SO_3 han sido confirmados cuali y cuantitativamente.

3) Los resultados obtenidos muestran claramente la acción del enyesado durante la elaboración del vino, acción ya conocida desde tiempos remotos en los países del Mediterráneo.

BIBLIOGRAFIA

FILIPOVIC, Slobodan. 1951. Exámenes fermentofisiológicos y bioquímicos sobre la fermentación sulfatada del mosto y el vino. Disertación. Bonn.

MARCILLA, Juan. 1950. Tratado práctico de Viticultura y Enología españolas. Tomo II. Madrid.

SANNINO, F. A. 1948. Tratado de Enología. Buenos Aires.

SCHANDER, Richard. 1904. Anales de la Unión de representantes de Botánica aplicada. Berlín.

WEIMANN, W. 1944. **Revista de investigaciones alimenticias.** (Zeitschrift für Nahrungsmitteluntersuchung und Forschung.) Tomo 87, págs. 49-52.

INSTITUTO I. B. Y. S.
SERVICIO DE ANTIGENOS

OPTIMO DE LATENCIA (*)

APORTACION AL ESTUDIO DE LA TOXICOGENESIS DIFTERICA

por
J. Seoane Porrúa.

En una nota publicada recientemente (1) aludíamos a las frecuentes y amplias oscilaciones que se observan en el título de los diferentes lotes de toxina diftérica obtenidos en el medio de Loiseau y Philipp (2); fijábamos la técnica seguida por nosotros en la preparación de este medio; dábamos un promedio de los resultados obtenidos en las determinaciones físicas y químicas efectuadas sistemáticamente en un grupo de lotes; comentábamos la influencia de las alteraciones cuantitativas de sus principales componentes; dábamos cuenta de la existencia de un factor, independiente del medio de cultivo, al que denominábamos «óptimo de latencia», que influía sobre la producción toxicogénica del Corynebacterium diptheriæ, y anotábamos los valores alcanzados en las toxinas obtenidas desde el conocimiento de la existencia de este factor.

Séanos permitido prescindir aquí, en lo posible, de la primera parte de nuestro trabajo; en primer lugar, porque ya hemos descrito minuciosamente la técnica a seguir en la preparación del medio de cultivo, señalando las modificaciones aportadas por nosotros y, en segundo lugar, porque consideramos independiente del medio de cultivo el factor a que aludimos y, por consiguiente, extensivo a otros medios de producción para la toxicogénesis diftérica.

Vamos, pues, a exponer nuevamente los resultados de nuestras observaciones sobre el tema concreto a que se refiere el título de esta Comunicación, ampliando datos y conceptos con nuevas aportaciones experimentales.

METODOS EXPERIMENTALES

En la publicación citada (1) definíamos el término «período de latencia» como el tiempo que media entre el final de la incubación de un pase de una estirpe toxígena de C. diphtheriæ y la fecha en que se verifica la siembra de enriquecimiento, a partir de la cual, previa incubación de veinte-

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 26 de noviembre de 1951.

veinticuatro horas, a 34° C., sembramos el lote de producción (*). Durante este período, en que la cepa de C. diphtheriæ (**) se conserva en hipoxibiosis, en la oscuridad, a 20-22° C., según el proceder descrito por Philipp (3), es de suponer que las funciones propias del metabolismo bacteriano continúen, si bien durante este estado de semilatencia se reduzcan al imprescindible recambio nutricio que asegure la vitalidad del germen. Cabía esperar, por lo tanto, que durante un período de tiempo prudencial en este estado de semilatencia, no estando influída por causas externas que alterasen su restringido metabolismo, una cepa de C. diphtheriæ no acusaría variación sensible en su capacidad toxicogénica.

Sin embargo, hemos podido comprobar que la realidad es muy distinta, y al sembrar fracciones de un lote único con pases de diferente antigüedad (es decir, con pases de diferente período de latencia) de la misma estirpe de C. diphtheriæ, los títulos de las toxinas obtenidas, valoradas por floculación, diferían ampliamente de unas fracciones a otras. Esto nos demostraba que en las anomalías observadas jugaba un papel esencial el estado de conservación de la cepa.

El estudio estadístico de los datos correspondientes a lotes de toxina diftérica obtenidos con anterioridad a este trabajo, parecían demostrar también que los valores más altos en el poder floculante correspondían a aquellos que habían sido sembrados con cepas de una antigüedad determinada y que este factor era visiblemente constante.

El resultado de nuestras experiencias para fijar la situación de los puntos correspondientes al máximo poder toxígeno de una cepa en función del período de latencia (fig. 1), nos ha llevado a la conclusión de que el poder floculante de las toxinas obtenidas a partir de fracciones de un lote único, sembradas con pases cuyo período de latencia es cero (es decir, sembradas inmediatamente después de una incubación de veinte horas, a 34° C.), nos dan un valor mínimo que puede oscilar entre 20-24 Lf. A partir de este punto, la curva representativa de estos valores crece, bastante regularmente, hasta alcanzar un máximo que corresponde a toxinas cuya siembra se verificó con pases de un período de latencia de ocho-diez días. En este punto, al que denominamos «óptimo de latencia», obtenemos toxinas que titulan bastante regularmente 60-70 Lf, alcanzando en algunos casos valores superiores a 100 Lf. A partir de este máximo la curva va decreciendo para volver a aumentar y alcanzar un segundo máximo, comparable en algunos casos al obtenido en el primer ascenso, hacia los veinticinco días de latencia.

Conforme aumenta el período de latencia las curvas obtenidas sufren alternativamente altas y bajas de poca intensidad, aunque algunas veces se pone de

(*) Modificación de Loiseau y Philipp (2) al medio de Martin.
(**) Park Williams, número 8 (Valls).

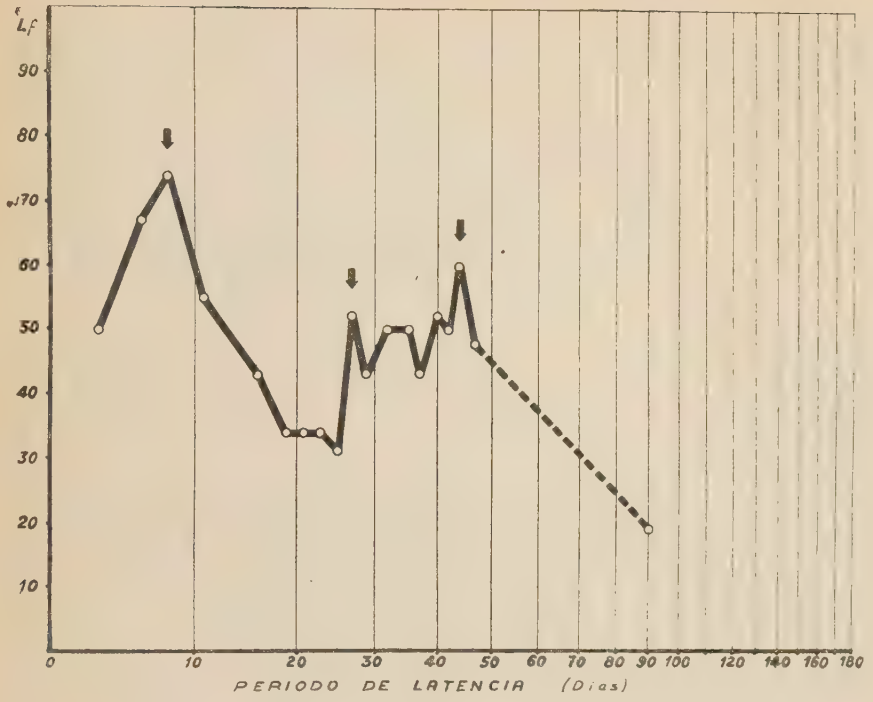


Figura I.—Gráfica representativa de los valores Lf de una toxina en función del "período de latencia" del pase sembrado.—Estos valores han sido obtenidos simultáneamente en fracciones de un lote único del medio de cultivo de producción, siendo también el mismo el medio de conservación de la estirpe en las diez primeras siembras.

manifiesto un tercer aumento, claramente definido, hacia los cuarenta y tres días. Generalmente, máximos y mínimos van distanciándose progresivamente, y acercándose y decreciendo sus valores límites.

Para evitar los errores motivados por los desplazamientos del «óptimo de latencia» y conseguir toxinas de valor constante y elevado, hemos pensado liofilizar una serie de pases de período de latencia comprendido entre ocho y diez días, y reservar el producto de liofilización correspondiente al pase en condiciones óptimas, señalado por lotes testigo.

Dada la circunstancia de que la capa de aceite de parafina dificulta la operación, hemos procedido a la liofilización de los velos correspondientes a las siembras de enriquecimento en el medio de Loiseau y Philipp, sin adición de azúcares ni de acetato sódico, envasados en ampollas al efecto.

Las ampollas reservadas correspondían a un pase que produjo un lote de toxina que tituló 62 Lf. Estas ampollas fueron conservadas a temperatura ambiente durante ocho meses, al cabo de los cuales dos de ellas fueron sembradas directamente en fracciones de prueba de dos lotes de distinta fabricación. Las toxinas obtenidas titularon, respectivamente, 60 y 66 Lf.

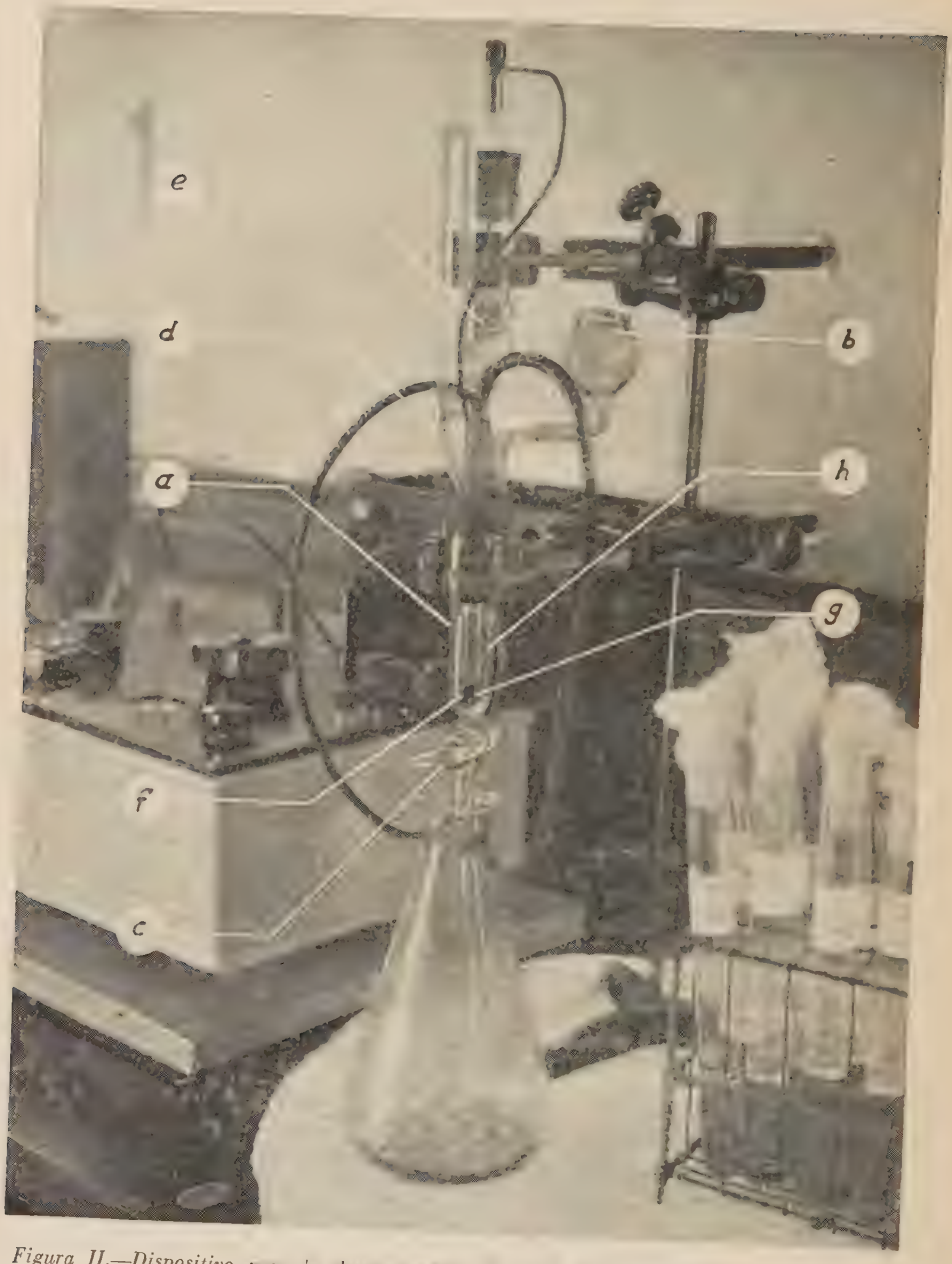


Figura II.—Dispositivo para la determinación en serie del potencial Redox de cultivos en hipoxibiosis: a) *Vaso de electrodos.*—b) *Embudo para la adición del cultivo y lavado de electrodos.*—c) *Llave de vaciado.*—d) *Puente de solución saturada de KCl. en gelosa al 2 por 100.*—e) *Electrodo de calomelanos.*—f) *Electrodo de platino brillante.*—g) *Electrodo de platino dorado.*—h) *Electrodo de antimonio.*

Aunque parece ser que el período óptimo de latencia se conserva por liofilización, acogemos estos datos con la correspondiente reserva, dado el corto número de pruebas efectuadas hasta la fecha.

Al considerar que un estudio sistemático de los potenciales eléctricos podría ayudarnos a desentrañar la etiología de este fenómeno, hemos efectuado una serie de determinaciones del potencial Redox del medio de cultivo a partir de su inoculación.

Estas determinaciones potenciométricas, siguiendo a Hewitt (4), han sido efectuadas directamente en el medio de cultivo tal como se encuentra, limitándonos a hacer las lecturas en igualdad de condiciones (fig. II).

Hemos decidido representar las variaciones del potencial Redox expresadas en rH por haber comprobado que, en el medio de Loiseau y Philipp sin sembrar, el coeficiente angular de la representación gráfica del E_h en función del pH es prácticamente constante cuando estos valores caen dentro de los límites en que obra el C. diphtheriæ (es decir, dentro de su zona fisiológica).

Hemos empleado como referencia el electrodo de calomelanos (en solución saturada de KCl), y como electrodos inertes los de platino brillante y platino

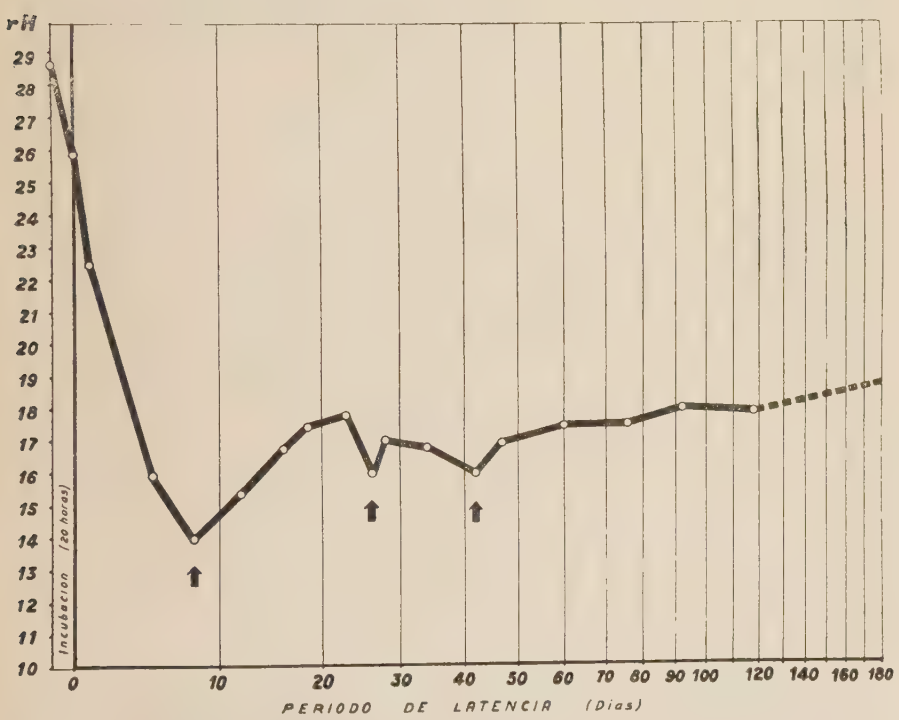


Figura III.—Gráfica representativa de las oscilaciones del potencial de oxidación-reducción (rH) del medio de conservación de la estirpe en función del "período de latencia".— Ha sido empleado el mismo medio en la determinación de los doce primeros valores.

dorado para el potencial Redox, tomando como real el valor medio de dos determinaciones, efectuadas una con cada uno de ellos y anulando los valores claramente discordes.

En las determinaciones simultáneas del pH hemos utilizado como electrodo de medida el de antimonio electrolítico.

Dada la circunstancia de que la capa de aceite de parafina protege al sistema de su contacto con el aire, la influencia perjudicial del oxígeno atmosférico es prácticamente nula en estas determinaciones.

Las lecturas han sido hechas a 20° C.

La curva representativa de los valores rH (*) encontrados, en función del período de latencia (fig. III), señala un brusco descenso del potencial del medio de cultivo que se inicia durante el período de incubación e implica una intensa actividad del metabolismo bacteriano. Su máxima acción reductora coincide con el «período óptimo de latencia». A partir de este punto, el potencial oscila en sus valores límites hasta una relativa estabilización, que suele ocurrir alrededor de los tres meses y que se mantiene aún después de cinco años, apreciándose tan sólo una ligera tendencia a la oxidación.

Los límites de caída del potencial Redox coinciden visiblemente con los valores máximos en la capacidad toxicogénica de la cepa, señalados anteriormente y las curvas representativas de ambas funciones (figs. I y III) pueden considerarse prácticamente simétricas.

CONSIDERACIONES

El «período óptimo de latencia» varía, como hemos dicho, entre los ocho y diez días, y aún, en algunos casos, hemos tenido la ocasión de comprobar desplazamientos más amplios. Estos desplazamientos son ocasionados por factores no sólo externos, y por lo tanto fáciles de controlar, sino también internos, dependientes del medio de cultivo. Unos y otros están íntimamente relacionados, por lo que esta división no tiene otro objeto que facilitar la exposición.

Entre las causas externas, de indudable efecto en el desplazamiento del período óptimo de latencia, figuran frecuentemente las siguientes:

a) Oscilaciones de la temperatura.
b) Acción de la luz.
c) Alteración del reposo.
d) Aireación.

Las oscilaciones de la temperatura, aun dentro de estrechos límites, y la

(*) Este valor, a 20° C., viene dado por la expresión $rH = \frac{E_h + 0{,}058\ pH}{0{,}029}$

acción de la luz, tienen gran interés por sus efectos catalizadores o inhibidores en determinados procesos del metabolismo bacteriano.

La alteración del reposo (trepidaciones, vibraciones, manejo obligado de las cepas) desgarra el velo, que puede sumergirse parcialmente, alterando las condiciones de vida del germen.

Estos factores no han sido objeto de estudio especial, ya que, como anteriormente indicábamos, son fácilmente controlables, pero hemos tenido ocasión de comprobar su acción en algunos casos.

Un factor sumamente importante lo constituye la aireación del medio de cultivo antes de la siembra. Walker (5) y Gladstone y colaboradores (6) llegan a la conclusión de que el CO_2 es necesario en muchos casos para la iniciación del crecimiento bacteriano. Nosotros hemos tenido la ocasión de comprobar que en los lotes de medio de cultivo recién esterilizados, y por lo tanto prácticamente exentos de O_2 y CO_2 disueltos, se retarda considerablemente la formación del velo o éste no llega a formarse. Conforme al método preconizado por varios autores, después de la esterilización abandonamos el medio a temperatura ambiente durante algunos días; durante este tiempo hemos tenido la ocasión de comprobar variaciones en los potenciales eléctricos, que se estabilizan prácticamente al cabo de cuatro-cinco días, pasados los cuales utilizamos el medio.

Las causas internas dependientes del medio de cultivo, de mayor interés que las anteriores y difícilmente controlables, podemos dividirlas como sigue:

e) Químicas.

f) Físicas.

Unas y otras van íntimamente ligadas a la naturaleza del medio. Aún en el caso mejor estudiado por nosotros, y sobre el que se basan la mayoría de nuestros ensayos (es decir, en el caso concreto del medio de Loiseau y Philipp), es indudable que no pueden obtenerse dos lotes de composición exactamente igual.

La influencia de estos factores (véase, por ejemplo, Mueller y colaboradores (7, 8, 9 y 10) nos la confirman los resultados de las pruebas de liofilización. Los valores obtenidos en las dos fracciones de prueba (60 y 66 Lf) difieren algo del poder floculante del lote testigo (62 Lf) e incluso en uno de los casos ha sido más elevado. Teniendo en cuenta que los lotes correspondientes a estas fracciones de prueba dieron valores más bajos (46 y 52 Lf), sembrados con un pase (sin liofilizar) de ocho días de latencia, deducimos que la composición química cuantitativa y las propiedades físicas del medio de cultivo de producción ejercen una indudable influencia en los valores absolutos alcanzados, independientemente del óptimo de latencia.

Es de suponer que estos factores, cuando afectan al medio de conservación de la estirpe, tengan también influencia en el desplazamiento del óptimo de

latencia, probablemente retardando o favoreciendo la fase logarítmica de crecimiento.

El aumento de la proporción de gérmenes Gram negativos, que va seguida de irregularidades morfológicas, con predominio de formas cocoides, mazudas, ramificadas o anormalmente largas, y que se traduce en una disminución de su poder toxicogénico, puede tener el mismo origen.

Estas anomalías van precedidas frecuentemente de retardo en su crecimiento y se consigue fácilmente su regresión a formas típicas al cambiar el lote del medio de cultivo, lo que también prueba su influencia sobre la cepa.

Por otra parte, asistimos frecuentemente a mutaciones espontáneas que se traducen en una tendencia de las colonias S a pasar a la fase R. Esta tendencia se pone de manifiesto por la aparición de un porcentaje, mayor o menor, de colonias en fase S-R cuando se disemina en placa. El origen de esta variación puede ser motivado también por todos o algunos de los factores anteriormente enumerados (Morton, 11). Como era de esperar, el aislamiento y siembra de cada uno de estos tipos de colonias nos ha dado valores Lf diferentes (véase, por ejemplo, Callao y Urioste, 12).

Son de todos conocidas las dificultades con que se tropieza en las determinaciones del potencial Redox cuando se efectúan en sistemas biológicos, y en especial en cultivos bacterianos, en que varía constantemente no sólo el potencial Redox, sino también el pH, la composición química, el número y características de los gérmenes (que se modifican al cambiar sus condiciones de vida) y otros.

Además, debemos tener en cuenta que los sistemas en los que entran en su composición extractos de órganos, cisteína, carbohidratos, etc., suelen ser sistemas irreversibles, en los que el potencial no se condiciona por la proporción entre las formas oxidadas y reducidas, sino que depende casi exclusivamente de la concentración de la forma reducida. Un potencial de este tipo sólo puede utilizarse, por lo tanto, como medida aproximada de la capacidad reductora del sistema, sin significación termodinámica, por lo que no tiene nada que ver con la energía libre (Michaelis y Rona, 13).

Por otra parte, la presencia de oxígeno molecular ejerce en los electrodos de metal una influencia propia y además cambia lentamente el estado del sistema al actuar como oxidante.

Por todas estas razones, se deduce que las cifras de potencial encontradas por nosotros carecen de valor absoluto, pero ponen de manifiesto ciertos estados peculiares del medio sembrado en un momento dado e, indirectamente, del germen.

Es indudable que estos hechos sugieren numerosos ensayos relacionados con las fases de germinación, los fenómenos de intermitencia en la fase logarítmica descritos por Rogers y Greenbank (14) e Hirsch (15), la influencia de

la temperatura, algunas de las modificaciones químicas del substrato, y otras muchas, así como la posibilidad de su aplicación a otros gérmenes productores de toxina. Algunos de estos ensayos los tenemos actualmente en vías de experimentación.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

I) El poder floculante de una toxina diftérica está condicionado por un estado peculiar que adquiere la cepa sembrada durante su estado de latencia y que parece conservarse por liofilización.

II) Las determinaciones potenciométricas verificadas en pases de diferente antigüedad de una estirpe de C. diphtheriæ señalan valores distintos del potencial Redox del medio de cultivo. Los valores mínimos coinciden con un aumento de la capacidad toxicogénica del germen.

III) La máxima caída del potencial Redox se corresponde, en todos los casos, con el «óptimo de latencia» para la producción toxicogénica.

Para la estirpe de C. diphtheriæ, Park Williams, núm. 8 (Valls), conservada en la oscuridad, a 20° C., en hipoxibiosis, en el medio de Loiseau y Philipp, sin adición de azúcares ni de acetato sódico, este límite de caída del potencial Redox suele ocurrir entre los ocho y diez días de latencia.

Reconocimiento.

A los Drs. Ruiz Falcó, Cordón, M. Marzal, Otegui y Pascual Terrats, por sus orientaciones, facilidades y desinteresada colaboración.

SUMMARY

I) The flocculation power of a diphtheric toxin is determined by a peculiar condition that the cultured strain gets during its latence period and it seems preserved by lyophilization.

II) The potentiometric valuations on cultures of various ages of a C. diphtheriæ strain gives different values of the Redox potential of the culture medium. The minimal figures are coincident with the increase of the organism toxigenic capacity.

III) The maximum declination of Redox potential is coincident, in every case, with the «optimal latence» for the toxigenic production.

For the C. diphteriæ strain Park Williams no. 8 (Valls) preserved in hypoxibiosis at 20° C. in the darkness, on the Loisseau and Philipp culture medium, without sugars nor sodium acetate, this limit of Redox potential declination is apt occur between the 8th and 10th day of latence.

BIBLIOGRAFIA

(1) SEOANE, J.—Rev. I. B. Y. S., 3, 103 (1951).

(2) LOISEAU, G. y PHILIPP, M.—Ann. Inst. Pasteur, 62, 469 (1939).

(3) PHILIPP, M.—Ann. Inst. Pasteur, 62, 509 (1939).

(4) HEWITT, L. F.—Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry, 2.ª ed., 1933 (London).

(5) WALKER, H. H.—Science, 76, 602 (1932).

(6) GLADSTONE, G. P., FILDES, P. y RICHARDSON, G. M.—Brit. J. Exp. Pathol., 16, 335 (1935).

(7) MUELLER, J. H.—J. Bact., 19, 515 (1935).

(8) ———— J. Bact., 36, 499 (1938).

(9) ———— Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 40, 632 (1939).

(10) SIDNEY, C., SNYDER, J. C. y MUELLER, J. H.—J. Bact., 41, 581 (1941).

(11) MORTON, H. E.—J. Bact., 40, 755 (1940).

(12) CALLAO, V. y URIOSTE, R.—Rev. San. e Hig. Púb., 16, 240 (1942).

(13) MICHAELIS, L. y RONA, P.—Praktikum der Physikalischen Chemie imbesondere der Kolloidchemie, 4.ª ed., 1930 (Berlín).

(14) ROGERS, L. A. y GREENBANK, G. R.—J. Bact., 19, 181 (1930).

(15) HIRSCH, J.—Klin. Wschr., 12, 191 (1933).

INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE GRANADA
C. S. I. C.

ESTUDIOS SOBRE LA FERMENTACION DEL ESPARTO

III. LA EVOLUCION DEL AMONIACO EN EL PROCESO DEL ENRIADO DEL ESPARTO (*)

por
Vicente Callao y Eduardo Esteban Velasco.

En un trabajo anterior (1) se han puntualizado los resultados conseguidos estudiando experimentalmente, en el laboratorio, la flora aerobia que concurre en el proceso del enriamiento del esparto.

Prosiguiendo nuestros estudios, como allí ya indicamos, nos hemos dirigido a realizar observaciones en balsas donde se realiza industrialmente la fermentación por una firma comercial de Granada, a fin de comprobar los resultados experimentales y de conocer las peculiaridades biológicas y bioquímicas que concurren en el proceso de preparación de esta fibra textil. Nuestras observaciones, que serán objeto de una próxima publicación (2), han logrado poner de manifiesto que, fundamentalmente, la flora aerobia en las balsas no sufre variación en relación con las características bioquímicas observadas en nuestras investigaciones del laboratorio, y que la flora anaerobia, que interviene en el enriado de una manera natural, se reduce casi exclusivamente a la presencia de Clostridium del tipo del Cl. butyricum.

En esta publicación vamos a dar cuenta de los resultados alcanzados en relación con la producción de amoníaco observada durante el proceso fermentativo.

MATERIAL Y METODOS

Se ha utilizado el agua de las balsas de «Espartera, S. A.», entidad industrial que lleva a cabo el proceso de enriamiento del esparto, el cual utiliza para la preparación de fibra destinada a la fabricación de cordelería y enseres de esta planta, en la vega granadina, a unos dos kilómetros de la capital. Las tomas de las nuestras se llevaron a cabo utilizando largas pipetas que se

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 28 de enero de 1952.

sumergían en el interior de la balsa, y el agua se transportó al laboratorio en matraces estériles y limpios químicamente, con objeto de llevar a cabo su análisis lo más rápidamente posible, con un tiempo máximo de media hora entre el momento de la toma y el de dar comienzo a las preparaciones analíticas.

Las experiencias se han realizado en tiempos diferentes, a fin de tener en cuenta la influencia posible de los factores ambientales y, en especial, de la temperatura sobre el proceso.

El método de enriamiento se lleva a cabo en las balsas de la firma industrial antedicha en dos tiempos: primeramente se llenan de agua, habiendo introducido antes en ellas los manojos de la fibra vegetal, y se tienen así durante un espacio de tiempo que varía, sin que haya otra razón aparente que la temperatura, entre los trece y los diecisiete días (a veces los tienen menos de trece días). En este momento, determinado únicamente por la experiencia práctica de los operadores, se vacía totalmente el agua de las balsas, llenándolas de nuevo con agua limpia y dejándolo estar así hasta que se juzgue, también empíricamente, que ha terminado el proceso, durante unos ocho a doce días más. El tiempo total del enriado en esta fábrica oscila entre dieciocho a treinta días, aproximadamente.

Las aguas extraídas diariamente se analizaron en relación con su aspecto macroscópico, reacción y determinación del amoníaco disuelto en ellas, así como se hicieron experiencias paralelas en la fibra antes y después de haber sido sometida al enriado (en uno de los lotes solamente) para determinar su contenido en nitrógeno.

La presencia del amoníaco en las aguas se comprobó por el reactivo de Nessler, así como por los abundantes humos blancos que se forman cuando se calienta en un tubo de ensayo, al que se aplica una varilla impregnada con HCl.

La valoración del amoníaco en las mismas se realizó por destilación, determinándose separadamente el amoníaco libre y el combinado. La suma nos da a conocer el total.

La técnica de valoración fué como sigue: se parte de 50 ml. de agua de las balsas, que se colocan en un Erlenmeyer de 250 c. c. tapado con un corcho, que atraviesa un tubo unido a un refrigerante Liebig, con el que llevaremos a un mínimo las pérdidas de amoníaco que podrían existir al ser arrastrado por el vapor producido en la ebullición. Este refrigerante termina en un tubo acodado cuyo extremo final, libre y afilado, se introduce en un matracito que contiene 10 ml. de solución de H_2SO_4 N/10. Se calienta el Erlenmeyer, al principio suavemente, con el fin de evitar que con las burbujas del aire que se desprenden del aparato y que barbotean en la columna del sulfúrico se escape amoníaco, y después se eleva más la temperatura hasta la ebullición, continuando la destilación hasta que haya destilado un volumen aproximadamente

igual a la mitad del que al principio pusimos. Pasado este tiempo se enfría al chorro de la fuente en matraz de destilación, se completa con agua hasta el volumen primitivo, con objeto de que en la operación siguiente, al añadir la sosa no actúe sobre un residuo orgánico excesivo, provocando su descomposición, con el consiguiente error en los resultados finales. Se vuelve a destilar, en las mismas condiciones que la vez anterior, después de alcalinizar con un exceso de OHNa, introduciendo la punta libre del tubo acodado en otro matracito que contiene 10 ml. de H_2SO_4 N/10. Se valora el ácido sulfúrico en ambos matraces con OHNa N/10, representando los resultados de la primera valoración el amoníaco libre, y los de la segunda el combinado. Los resultados se dan en miligramos de amoníaco por litro. Las temperaturas nos han sido amablemente proporcionadas por el Observatorio Astronómico de la Cartuja de Granada, situado a una altura y a una distancia aproximadamente de la ciudad en relación con la fábrica del esparto.

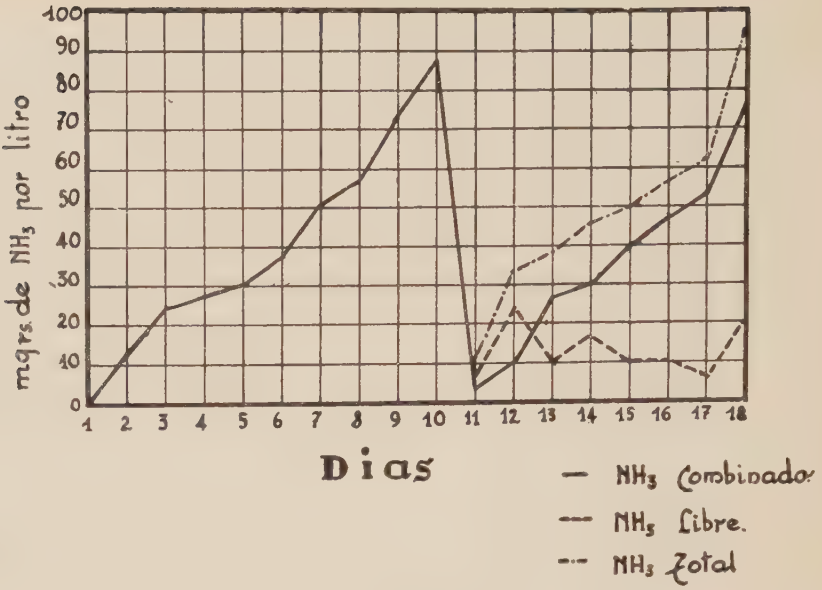
RESULTADOS

Las aguas son turbias desde el primer día del enriado, debiéndose tal propiedad a las materias que lleva el esparto consigo y que se extraen con su maceración, así como a los microbios que comienzan a desarrollarse poco a poco, contribuyendo a aumentar la turbidez. Su color, que en un principio es amarillento, va después oscureciendo hasta hacerse de un tono pardo muy pronunciado. La fermentación en las balsas transcurre de un modo muy parecido al que ya hemos descrito en las experiencias del laboratorio, acompañada de un olor desagradable y s u i g e n e r i s, que aumenta a medida que transcurre el tiempo y va acompañado de un abundante desprendimiento de gases, que forman espuma, la que se interfiere con la película bacteriana y protozoaria que se produce en la superficie de las balsas en funcionamiento y que es de un tono negruzco acentuado.

La reacción al papel de tornasol es primeramente ácida, correspondiendo a un pH aproximado entre 5,5 y 6,0 (las medidas potenciométricas serán discutidas en otra publicación), para hacerse después ligeramente ácida o neutra y con un final de alcalinidad franca. La acidez al tornasol se presenta siempre en los primeros días francamente.

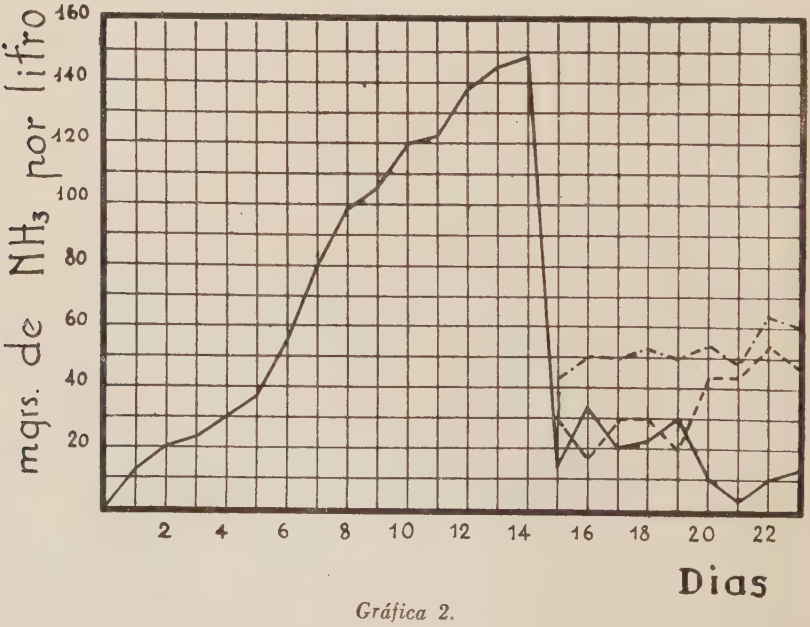
En uno de los lotes enriados fué determinada la cifra de N total por el método de Kjeldhal, resultando en el esparto crudo de 0,42 por 100 y descendiendo en el cocido a 0,28 por 100.

Las cantidades de amoníaco libre y combinado observadas en la fermentación de las balsas sometidas a nuestro estudio se ponen de manifiesto en las gráficas que se adjuntan.



Gráfica 1.

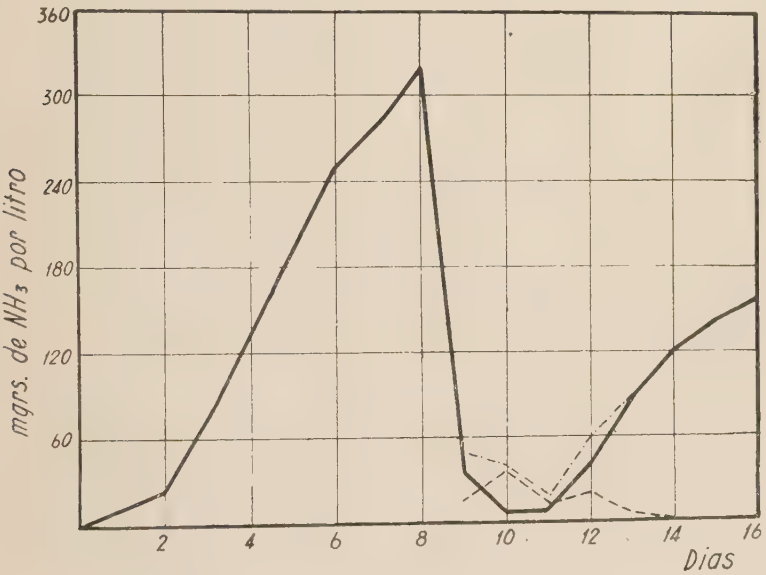
En la gráfica número 1, correspondiente a la balsa que comenzó el 20 de marzo de 1951 y terminó el 6 de abril (temperaturas medias: mínima, de 9,5°, y máxima, de 16,7° en este período), se observa que el amoníaco combinado asciende gradualmente hasta alcanzar una cifra máxima de 88,5 mg. por



Gráfica 2.

litro, el día 29 de marzo. En el día 30, y correspondiendo con el cambio de agua de la balsa, baja bruscamente la cifra a 3,4 mg. y comienza a aparecer amoníaco libre, que antes no se había observdo. El amoníaco combinado también se observa en cantidades crecientes a medida que transcurre el tiempo, siguiendo una marcha ascendente en su curva, paralela a las cifras que se determinaron en la primera parte del proceso, continuando así hasta el final del mismo, con una cifra de 78,3 mg. por 1.000, mientras que el amoníaco libre primero aumenta y luego permanece ligeramente estable, con tendencia a la disminución.

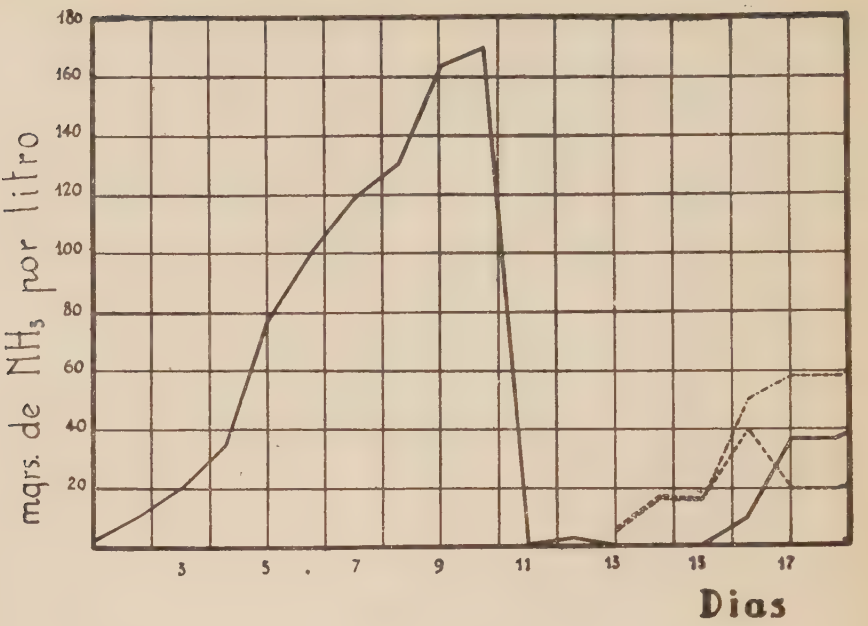
En la balsa comenzada el día 14 de abril del mismo año (gráfica núm. 2) y terminada el 6 de mayo (temperaturas medias: mínima, 9,4°, y máxima, 16,8°), las cosas ocurren de manera algo diferente, especialmente en lo que se refiere a la segunda etapa del enriado, en donde se observa primeramente cierto estado de equilibrio entre las cifras de amoníaco libre y combinado, hasta



Gráfica 3.

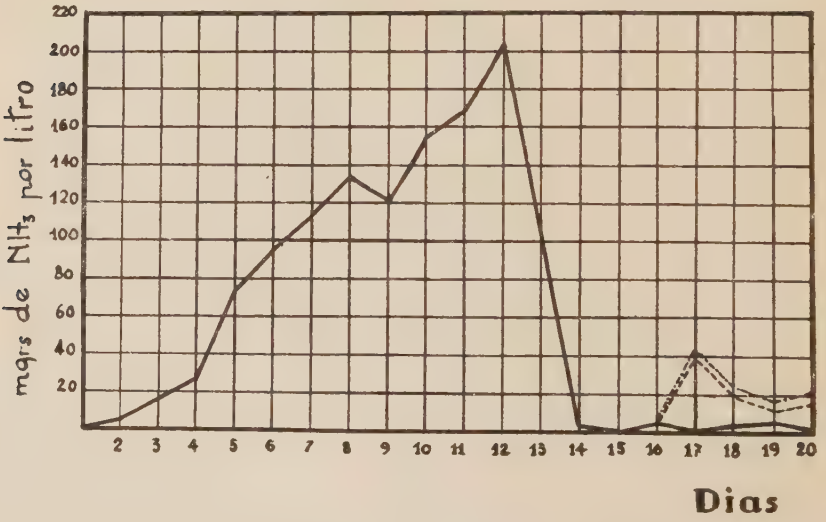
que, por fin, predomina de un modo evidente la superioridad del libre, que persiste aumentando hasta el final del tiempo de enriado.

En la gráfica número 3, que corresponde a la balsa que comenzó el día 11 de julio y terminó el 26 del mismo mes (temperaturas medias: mínima, 29,6°; máxima, 38,4°), observamos un ascenso rápido y mucho más elevado de la cifra de amoníaco combinado durante la primera fase de la operación, la que subió hasta la cantidad de 329,8 mg. por litro de agua en la balsa, al séptimo día del comienzo de la operación (influencia evidente de la elevada



Gráfica 4.

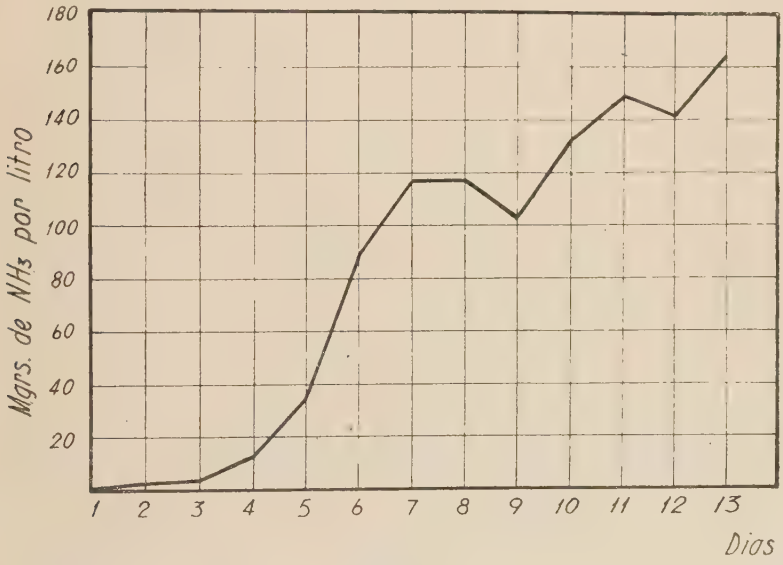
temperatura que se alcanzó en Granada en esta misma época). En la segunda fase del proceso se acusó también la presencia del amoníaco libre, con tendencia hacia la disminución de su cantidad, hasta llegar a desaparecer, mientras que la cifra del combinado aumentaba con una intensidad casi paralela al aumento observado durante el primer período.



Gráfica 5.

Los análisis correspondientes al lote que comenzó el día 20 de agosto y terminó el 7 de septiembre (temperaturas medias: mínima, 23,1°; máxima, 26,8°) demostraron una marcha semejante a las anteriormente consideradas en la primera fase de la operación (gráfica núm. 4) y en la segunda fase, es decir, desde que se cambió el agua de la balsa, comenzó también a aparecer la cifra de amoníaco libre rebasando la del combinado, hasta que, por fin, y ya finalizado el proceso, este último superó en cantidad al primero.

La gráfica número 5 corresponde a los valores analíticos de la balsa de enriamiento que comenzó el 25 de agosto de 1951 para finalizar el 16 de septiembre siguiente (temperaturas medias: mínima, 15,3°; máxima, 26,3°). En ella observamos algo semejante a lo que en gráficas anteriores se puso de manifiesto, es decir, una primera fase en la que sin existir amoníaco libre, asciende el combinado hasta alcanzar en el décimo día la cifra de 204 mg. por litro. Al cambiar el agua en el estanque, la cifra de este tipo de amoníaco se mantiene en las proximidades del cero, mientras que, por el contrario, apa-



Gráfica 6.

rece amoníaco libre, que aumenta, primero en cantidad bastante apreciable, para descender bastante rápidamente en las épocas finales de la operación.

En la gráfica número 6 exponemos los resultados que ocurrieron en el enriado comenzado el día 12 de septiembre, con temperaturas medias: mínima de 15,3°, y máxima de 21,3°. Los datos que en ella se consignan sólo son los correspondientes al primer período del enriado, y los observamos semejantes en un todo a los que en tal período aparecen descritos en todas las ante-

Gráfica 7.

riores gráficas. No se completó el análisis del agua de esta balsa hasta la terminación del proceso por circunstancias ajenas a nuestra voluntad.

La gráfica número 7, correspondiente a la balsa que comenzó el día 23 de julio de 1951 y terminó el 12 de agosto (temperaturas medias: mínima, 22,5°; máxima, 38,8°), es completamente diferente a las demás. La presencia de amoníaco combinado sufre oscilaciones importantes en su cantidad relativa y ello se debe a que por una avería ocurrida en el embalse se salía el agua, por lo que el enriado se condujo sustituyendo el agua perdida por la avería diariamente o en días alternos, en la cantidad igual a la de las pérdidas ocurridas, y por ello existen las referidas oscilaciones. Sin embargo, en los últimos días de la operación apareció también amoníaco libre demostrable.

DISCUSION

En el trabajo anterior ya citado indicábamos que, de acuerdo con las propiedades bioquímicas de las bacterias aerobias, aisladas en experiencias de enriamiento efectuadas en el laboratorio, los procesos de la fermentación del esparto ocurrían de manera diferente que el proceso de enriado de otras fibras textiles, como el cáñamo y el lino, que han sido perfectamente estudiados por numerosos autores.

Esta presunción allí establecida queda apoyada por los resultados que

comunicamos en este trabajo, porque la fermentación del lino ocurre con un desprendimiento de ácidos, que va aumentando gradualmente, hasta llegar al punto de la acidez permanente de Eyre y Nodder (3). Las medidas potenciométricas que Fuller y Norman (5) efectuaron en sus experiencias sobre el enriado del cáñamo indican asimismo un aumento de acidez que se verifica a través de todo el proceso de la fermentación de esta fibra textil.

En el enriamiento del esparto existe también en una primera parte del proceso fermentativo esa cifra de acidez, potenciométricamente mensurable, pero pronto tiende a disminuir hasta que desaparece y las medidas potenciométricas acusan una acidez muy débil, o una neutralidad ligera y algo persistente, primero, que se transforma en alcalinidad franca a medida que transcurre el tiempo y de manera más evidente en los últimos días del proceso fermentativo y aun, de manera más especial, en las condiciones por nosotros estudiadas, durante los momentos siguientes al cambio de agua en las balsas. Esta alcalinidad es debida a la existencia de amoníaco, el cual va acompañado de una pequeña cantidad de aminas, desprendidas también como consecuencia de la actuación fermentativa de los microbios.

Ya hemos visto, cuando estudiábamos las bacterias aerobias que existen en la fermentación del esparto, que en su mayor parte producen gran cantidad de amoníaco cuando las hacemos desarrollarse en agua de peptona o cuando crecen en medios con nitrato. Hemos también realizado experiencias, las cuales serán posteriormente ampliadas, y hemos observado que si sembramos con las aguas de las balsas placas de Agar-esparto-tornasolado, la mayor parte de los gérmenes aislados comienzan por enrojecer primero al tornasol ligeramente, para azulearlo en seguida, lo que nos hace suponer que estas bacterias aerobias utilizan primeramente los azúcares del medio, en virtud de ese escaso poder sacarolítico que poseen, formando ácidos a sus expensas, pero muy pronto, su capacidad proteolítica, hace que su metabolismo se dirija a la utilización de las substancias nitrogenadas, produciendo amoníaco en cantidades superiores a los ácidos primeros y manifestándose, como consecuencia, el viraje del medio tornasolado.

Por otra parte, el estudio de los anaerobios que hay en las balsas de fermentación y que pertenecen preponderantemente al tipo del Cl. butyricum, nos indica que el amoníaco no puede estar producido por esta clase de microbios porque no pueden formarlo, pues no tienen carácter proteolítico, sino que su metabolismo es intensamente sacarolítico y tampoco tienen la propiedad de reducir los nitratos. Estos gérmenes, por el contrario, son intensamente formadores de ácidos y para que se desarrollen no precisan la alcalinidad, sino más bien una depresión adecuada del potencial de óxido-reducción del medio en donde prosperan. Los anaerobios, pues, no pueden producir el amoníaco que encontramos en el proceso del enriamiento del esparto.

La formación del amoníaco en la fermentación del esparto comienza con el desarrollo de los gérmenes aerobios que se nutren a expensas de los productos extraídos de la planta por la maceración de la paja y va creciendo a medida que aumenta la proporción de semejantes gérmenes.

Si examinamos las gráficas que representan las cantidades de amoníaco en el transcurso del proceso, podremos observar que la uniformidad de la curva es constante, si exceptuamos lo que ocurre en la gráfica número 7, en donde existen circunstancias diferentes a las demás, pero cuyos resultados apoyan las presunciones que se deducen de las restantes curvas.

Es algo que llama la atención en todas las balsas examinadas, que a pesar de la cifra elevada de amoníaco que se demuestra en el primer período de la fermentación, éste se encuentra en una forma combinada y no libre como a priori podríamos suponer. Esta combinación ocurre por unión química con otras substancias disueltas en el agua de maceración y existen indicios para suponer que aparece combinado, dando lugar a la formación de sales amoniacales orgánicas. Estos compuestos amoniacales van aumentando de manera lineal en las balsas hasta alcanzar alturas variables en relación con las temperaturas habidas durante el tiempo de la fermentación, como podremos observar en el cuadro adjunto, coincidiendo el aumento de la cifra de amoníaco con el aumento de la capacidad metabólica de los microbios, como consecuencia de la mayor temperatura. Al mismo tiempo, el período de enriamiento disminuye en las balsas sometidas a temperatura más elevada.

En la gráfica número 7, expresión de los fenómenos que ocurrieron en una balsa averiada, a la que se añadía diariamente o alternativamente el agua perdida, en cantidades variables, observamos subidas y bajadas de la cifra de amoníaco en relación con la cantidad de agua añadida. La temperatura ambiente, alta, hizo que las cifras de amoníaco fueran elevadas.

CUADRO NUM. 1

RELACION ENTRE LA CANTIDAD DE AMONIACO Y LA TEMPERATURA AMBIENTE

Fechas de comienzo de las balsas	*Temp. medias*	*Temp. máximas*	*NH_3 en la primera fase* — mg. por 1.000	*NH_3 total al final* — mg. por 1.000
20 de marzo	9,5°-16,7°	16°-22°	88,55	98,76
14 de abril	9,4°-16,8°	18°-27,2°	136,24	61,30
11 de julio	29,6°-38,4°	31°-39,3°	329,8	153,0
23 de julio	22,5°-38,8°	30°-39,5°	207,4	125,8
20 de agosto	23,1°-26,8°	29°-37°	170,0	68,0
25 de agosto	15,3°-21,3°	29°-36°	204,0	20,4
12 de septiembre..	15,3°-21,3°	24°-30°	163,2	——

Podemos dividir en dos etapas el proceso de enriamiento, tal como se lleva a cabo en la instalación industrial que estamos estudiando, en relación con la operación mecánica del cambio de agua en las balsas. Durante el primer período, es decir, cuando el agua permanece sin cambiar, aumenta ascendentemente el amoníaco combinado. En el segundo período aparecen las dos formas, libre y combinado. Para explicar semejante hecho, nosotros suponemos (hipótesis que estamos ahora intentando comprobar) que el amoníaco que forman los aerobios durante el primer período se combina con los ácidos orgánicos que producen los anaerobios, formando sales amoniacales de los mismos (acetato, butirato, valerianato, etc.), a las que se debe el efecto regulador que permite a las aguas poseer una reacción aproximadamente neutra.

En el segundo período, al extraer el agua primitiva desaparece con ella todo el amoníaco combinado que existía en los tanques. Entonces los gérmenes anaerobios, que ocasionan la descomposición de las pectinas, no encuentran suficiente cantidad de las mismas para descomponer, en primer lugar porque cesa la condición de anaerobiosis al añadir agua nueva que llevará oxígeno disuelto y cesarán en sus actividades metabólicas, hasta que vuelva a descender el potencial Redox de las aguas nuevas del tanque, por la acción de los aerobios, y en segundo lugar, porque hayan podido desaparecer esas pectinas o reducirse por agotamiento. Entonces no se producirán ácidos orgánicos en cantidad suficiente para saturar el amoníaco que los aerobios no cesan de producir y quedará éste disuelto en forma libre o evaporándose. Esto ocurre algunas veces, como lo hemos visto en las gráficas números 2 y 5. Otras veces (gráfica 1) seguirán formándose ácidos en mayor cantidad, pero aún no bastante para neutralizar todo el amoníaco existente, mientras que en otras ocasiones (gráfica núm. 3), después de un período inicial en el cual la cifra de amoníaco libre excede a la de los ácidos grasos formados por los anaerobios, continúa la actividad de estos últimos, cada vez más acentuada, para formar ácidos que saturen todo el amoníaco producido por los aerobios que intervienen en el enriado.

Mediante esta teoría podemos explicarnos algunos hechos que se observan en la fermentación, como la reacción ácida primera que ocurre y que pronto se transforma en neutralidad o ligera alcalinidad, durante la primera fase, y la alcalinidad final franca del último período. También puede explicarse el hecho que a Fernández Prida y colaboradores (4) parece inexplicable, en relación con la alcalinización de las aguas de enriado del esparto que ellos observaron en su laboratorio, sin intervención aparente de causa exterior alguna, porque las aguas de la maceración, cuando están fuera de la balsa y apartadas de la fibra que sufre la fermentación, continúan sirviendo de pábulo nutritivo a la fibra aerobia que continúa allí desarrollándose y produciendo amoníaco en cantidades que saturan los ácidos grasos que formaron los anaerobios en la

balsa y que fuera de aquellas condiciones ya no continúan produciéndose porque ya no encuentran fibra que fermentar. Al no haber ácidos grasos que se combinen con el amoníaco, éste se disuelve como tal, aumentando así la alcalinidad. Es por ello por lo que para tener seguridad en los datos analíticos que se investigan en las aguas de fermentación sea preciso realizarlos inmediatamente después de la toma de las muestras.

El origen del amoníaco y de las aminas que se forman durante el enriamiento del esparto es cuestión que estamos investigando en estos momentos. Los gérmenes aerobios que ocurren en la fermentación del esparto pueden formar amoníaco en virtud de dos mecanismos diferentes: 1.º Por la reducción de los nitratos que pueden pasar a NO_2 y a NH_3. 2.º Por su capacidad proteolítica, desintegrando las proteínas con la descomposición final de los aminoácidos que las componen, bien por desaminación, lo que explicaría la formación de amoníaco, bien por descarboxilación, lo que explicaría la producción de aminas, que también ocurre.

Las aguas de enriado usadas en la fábrica granadina estudiada contienen nitratos en cifras bastante perceptibles. Los datos analíticos de las cenizas del esparto, tomados de la publicación de Soler y Guzmán (6), no consignan la presencia de nitratos en el esparto, por lo que si el amoníaco proviniese de los nitratos no estaría, seguramente, en las elevadas cifras que lo hemos hallado.

Según datos de Soler y Guzmán, la fibra de esparto crudo posee cierta riqueza en proteínas. Los análisis en relación con el contenido en nitrógeno total de la misma, antes y después de haber sido sometida a la operación del enriamiento, son significativos y pueden darnos cierta luz en relación con el origen posible del amoníaco.

Nosotros hemos encontrado en un lote sometido a un enriamiento de dieciocho días unas cifras de 0,48 por 100 de N en crudo y de 0,28 por 100 en el enriado. Diferencia, 0,14 por 100.

Las cifras que dan Fernández Prida y colaboradores también son elocuentes, pues en uno de los lotes analizados por ellos a este respecto dan las siguientes:

Crudo, 0,48 por 100; a los nueve días de enriado, 0,44 por 100; a los dieciocho días, 0,38 por 100; a los veinticuatro días, 0,35 por 100, y a los treinta y cuatro días, 0,06 por 100, lo que indica una pérdida progresiva del nitrógeno de la paja, a medida que avanza la fermentación, coexistiendo esa ganancia progresiva durante la misma del amoníaco, que nosotros hemos puesto de manifiesto. Parece ser, pues, que el amoníaco proviene de las proteínas del esparto y a comprobar este aserto se dirigen actualmente nuestras investigaciones.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha demostrado que la fermentación del esparto transcurre con liberación de grandes cantidades de amoníaco, el cual aparece combinado con otras substancias disueltas en las aguas de maceración. Hay indicios para suponer que estos substancias sean ácidos grasos inferiores.

En los últimos períodos del enriado aparece amoníaco libre.

La cantidad de amoníaco desprendida asciende a medida que progresa el proceso, está en relación con la temperatura y puede suponerse que se forma por la acción de las bacterias aerobias que intervienen en la compleja fermentación del esparto.

Se discuten las posibilidades del origen de este amoníaco.

BIBLIOGRAFIA

(1) **CALLAO, V.,** y **VIGARAY, J.** 1951. Estudios sobre la fermentación del esparto. I. Flora aerobia de la fermentación en el enriado experimental. **Anal. Edaf.,** X: 525.

(2) **CALLAO, V.,** y **MONTOYA, E.** 1952. Estudios sobre la fermentación del esparto. II. Flora de la fermentación en las balsas (trabajo en preparacion).

(3) **EYRE, J. V.,** y **NODDER, C. R.** 1924. **Jour. Text. Inst.,** vol. XIV, pág. 237.

(4) **FERNANDEZ PRIDA, C.; TORNER OCHOA, A.,** y **MARCOS DE LANUZA, J.** 1951. Estudios y experiencias sobre el esparto. **Publicación del Servicio del Esparto,** pág. 119. Madrid.

(5) **FULLER Y NORMAN, A. C.** 1946. The Retting of Hemp. Ames.

(6) **SOLER, A.,** y **GUZMAN, G.** 1951. Contribución al estudio del esparto español. **Publicación de la Universidad de Murcia.** Murcia.

INSTITUTO I. B. Y. S.
LABORATORIO DE BIOQUIMICA

MODIFICACION DEL METODO DE G. RAMON PARA VALORAR LA ANTITOXINA DIFTERICA (*)

por
F. Cordón y A. Martínez.

I

En el curso de los trabajos emprendidos en el Laboratorio de Bioquímica del «Instituto de Biología y Sueroterapia (I. B. Y. S.)», de Madrid, con el fin de desespeciar, por digestión con pepsina, el plasma antidiftérico equino (dicho con mayor precisión, con el fin de destruir, por dicha proteolisis, la capacidad antigénica del plasma, conservando, en lo posible, la actividad «anticuerpo»), era evidentemente necesario disponer de un método cómodo y seguro para valorar la antitoxina, que permitiera seguir el efecto de la digestión proteolítica sobre la actividad «anticuerpo». En un trabajo sistemático intenso no puede elegirse para valorar los anticuerpos la medida de su capacidad de neutralizar el efecto letal de la toxina para el cobayo, porque cada valoración requiere cuatro días, con la consecuencia, prescindiendo del enorme número de animales exigido, de comunicar al trabajo un ritmo muy lento. Quedaba, pues, como única alternativa la valoración por el método de floculación de G. Ramon.

Sabido es que a G. Ramon se debe la observación de que la antitoxina diftérica, además de neutralizar el efecto tóxico de la toxina a la que debe su formación, precipita con ella en condiciones apropiadas. [De pasada recordaremos la importancia que esta observación tuvo en favor de la corriente teórica hacia la unidad de los anticuerpos que poseen la misma especificidad, a pesar de los efectos aparentemente distintos (precipitación, aglutinación, neutralización del efecto tóxico, etc.) que hoy se sabe debidos al distinto estado físico del antígeno; esta unidad se admite actualmente por todos los inmunólogos y se completa, por otra parte, con el descubrimiento moderno de la semejanza química entre los anticuerpos de distinta especificidad, que, como es sabido, son todos seroglobulinas (en general γ).]

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles, el día 28 de enero de 1952.

Dicha doble propiedad de un mismo anticuerpo permitió a G. Ramon (1) valorar la capacidad de un suero antidiftérico para neutralizar la toxina correspondiente, utilizando como indicador de la neutralidad, en vez de la pérdida de la toxicidad para el cobayo (método de Ehrlich), el efecto floculante *in vitro* del suero con el antígeno. Ramon, como es sabido, para establecer su método aprovechó la notable propiedad de que de una serie de mezclas en proporciones gradualmente variables de toxina y antitoxina diftéricas precipiten primero las mezclas en que las cantidades de toxina y antitoxina son prácticamente equivalentes (la zona del óptimo de floculación coincide con la zona de equivalencia, en la que el líquido que sobrenada al precipitado no tiene antígeno ni anticuerpo). Recordamos que Ramon, para valorar los anticuerpos antidiftéricos, prepara una serie de mezclas en las que se mantiene constante la cantidad de toxina, de título conocido, y se varía, en cambio, gradualmente la cantidad de plasma o suero problema; se incuban las mezclas en termostato a menos de 50° y se tienen bajo observación para apreciar cuál de ellas es la primera que flocula; la cantidad de toxina y antitoxina de esta mezcla es equivalente y mide, por tanto, las unidades de antitoxina del suero.

Ahora bien, al intentar aplicar el método de Ramón para valorar el contenido de anticuerpos antidiftéricos en los digeridos de plasma inmune equino, tropezamos con dificultades imprevistas, que hacen, en este caso, impracticable el método; estas dificultades se deben a modificaciones que la digestión péptica impone al plasma problema: 1.°, influencia irreversible del pH ácido a que hay que efectuar la digestión péptica; 2.°, influencia de la presencia de productos floculantes procedentes de la demolición de proteínas del plasma por la pepsina, y 3.°, modificaciones debidas a la alteración de la molécula del anticuerpo por efecto de la hidrólisis péptica. Vamos a considerar someramente cada uno de estos efectos perturbadores.

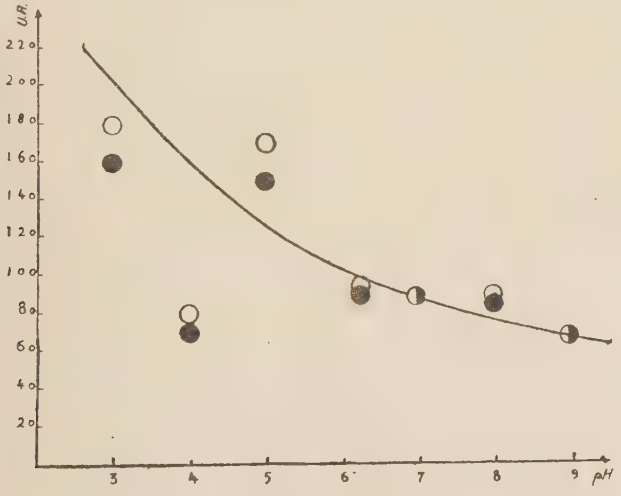
1. *Influencia del pH a que hay que llevar el plasma para efectuar la digestión.* El esclarecimiento experimental de la influencia del pH se estudió directamente en plasma antidiftérico sin digerir y sin pepsina llevado a pH ácido, con el fin de excluir las restantes influencias posibles procedentes de la digestión. Anto todo, es evidente que no se puede mezclar un plasma a pH ácido con una toxina a su pH habitual (aproximadamente, 8,0) sin que las proteínas de uno u otro líquido, según sea el pH a que quede la mezcla, pasen por el punto isoeléctrico, con peligro de simples insolubilizaciones absolutamente independientes de toda reacción inmune. En nuestro caso, la mezcla, debido a que en ella la concentra-

(1) G. Ramon publicó una revisión detallada de sus comunicaciones acerca del método de floculación para dosificar algunas toxinas y anatoxinas y los anticuerpos correspondientes, en 1940. *Revue de Immunol.* 6: 65.

ción proteica de la toxina es mayor que la del plasma, queda a un pH próximo al de la toxina, y, como consecuencia, son las seroproteínas las que se insolubilizan en parte al pasar por el punto isoeléctrico; tales precipitados se redisuelven mal, y, por otra parte, tampoco pueden eliminarse por filtración, por ser, posiblemente, más o menos ricos en anticuerpos. Intentamos evitar esta dificultad llevando el plasma ácido al pH neutro inicial por la adición brusca de la sosa necesaria bajo una agitación enérgica; de este modo, en efecto, se evita que los precipitados se formen, o al menos se consoliden, durante el cambio de pH; pero al valorar sueros así devueltos a su pH inicial, de modo que queden transparentes, se observa que el haber estado una vez en medio ácido les ha producido un cierto trastorno irreversible, debido al cual los precipitados inmunes se observan con dificultad verdaderamente extraordinaria, el tiempo de floculación se prolonga muchísimo (a veces días) y, por último, al comparar la valoración de un plasma así tratado con la de él mismo antes de ser acidulado (es decir, en estado nativo) se obtienen resultados distintos.

Pero hay todavía más; cuando el plasma se lleva a un pH igual o inferior a 2,7, que puede ser de elección para la digestión péptica, se enturbia de modo irreversible —es decir, que no puede corregir la adición brusca de sosa bajo agitación, ya que este modo de operar no tiene más papel que impedir la formación de precipitados, pero no de redisolverlos— y hay que tener en cuenta que cualquier turbidez enmascara las tenues floculaciones inmunes que constituyen el indicador de estas valoraciones.

Cabe, pues, únicamente la posibilidad, cuando el plasma se mantiene transparente en medio ácido, de observar las floculaciones inmunes al mismo pH ácido, llevando previamente la toxina, por adición brusca de ácido, al pH del



Gráfica 1.

plasma. Ahora bien, la condición previa necesaria para que las valoraciones así efectuadas en medio ácido sean correctas es que sus resultados coincidan con los paralelos efectuados del modo ordinario. Es decir, aun suponiendo que fueran físicamente practicables, pensamos que la «valencia» (capacidad de neutralización) del anticuerpo con respecto al antígeno podría influirse por el pH; nuestros experimentos confirmaron ese temor. Llevamos plasma antidiftérico y toxina diftérica por separado a cada uno de los diversos pH, se contrifugaron uno y otra y se valoraron entre sí los líquidos puestos al mismo pH; de este modo se estableció la gráfica adjunta, dos veces con el mismo resultado; en ella se contrapone la valoración de un mismo plasma con una misma toxina a diferentes pH (gráfica 1).

Como se ve en la gráfica, el pH influye sobre la valencia aparente del anticuerpo con respecto al antígeno (es decir, sobre la zona de floculación óptima); concretamente, la valencia de la antitoxina con respecto a la toxina parece aumentar al bajar el pH (a pH 4,0 se observó, además, en ambos experimentos, un resultado anómalo que tal vez se deba a que a este pH, inmediato al punto isoeléctrico (1), se insolubiliza una proporción de anticuerpos del suero superior a la equivalente de antígenos de la toxina). Queda la duda de si la alteración de la valencia —del antígeno, del anticuerpo o de ambos— en medio ácido indica una modificación real de la reacción o se debe a una mayor insolubilización de la toxina a este pH. Del examen de la curva se deduce que entre los pH 6 y 9 el método de Ramon es independiente del pH. También se deduce que este método pudiera tal vez aplicarse en medio ácido, ya que el perfil de la curva parece bien definido, sin más que multiplicar los resultados obtenidos a un pH ácido —por ejemplo, 3— por 0,6, que, según la gráfica, parece ser el factor de conversión del resultado en medio ácido en el resultado obtenido en las condiciones ordinarias. Desgraciadamente, como se dijo, los flóculos formados a estos pH ácidos se observan muy difícilmente, el tiempo de floculación es prolongadísimo y casi todos los flóculos aparecen casi simultáneamente en muchas mezclas con distintas proporciones de antígeno y anticuerpo, de modo que el método no resulta conveniente para ser utilizado en la práctica de rutina.

2. A las alteraciones irreversibles que experimenta el plasma equino antidiftérico cuando es llevado a pH ácido hay que sumar la aparición en el curso de la hidrólisis péptica de enturbiamientos y precipitados

(1) Se determinaron los puntos isoeléctricos tanto de la *toxina diftérica* empleada en las valoraciones como del *suero antidiftérico* equino. Denominamos punto isoeléctrico el pH en que se observa la insolubilización máxima con uno y otro producto, haciendo la salvedad de que en ambos casos se trata de mezclas de múltiples substancias anfóteras de distintos puntos isoeléctricos. En ambos productos, el punto isoeléctrico es, aproximadamente, 3,8.

constituídos por substancias procedentes de la demolición de las seroproteínas. Tales turbideces se redisuelven también difícilmente, y cuando se aglomeran en precipitados fácilmente separables, éstos pueden contener una cantidad variable de anticuerpos. La índole de estos precipitados, de evidente interés para el objeto general de nuestro trabajo (la desespeciación de los plasmas antidiftéricos), ha sido motivo de estudio particular, en el que no entramos porque rebasa del tema concreto de esta nota.

3. Durante la hidrólisis péptica, la globulina inmune (antitoxina diftérica) está sometida a una demolición paralela a la de las globulinas normales del mismo plasma; es sabido que no hay ninguna diferencia física ni química entre seroglobulinas normales e inmunes, si se exceptúa la afinidad de éstas con su antígeno. La aplicación de la hidrólisis péptica a la desespeciación del plasma equino se funda, pues, simplemente en que la pérdida de la antigenicidad de las seroglobulinas (entre las que se cuenta el anticuerpo antidiftérico) se produce antes de que se destruya en gran proporción la función del anticuerpo (1). Lo anterior significa que en un suero digerido convenientemente, de modo que deje de ser antigénico (es decir, que ya no sensibilicen sus «seroproteínas de caballo») y, en cambio, conserve en parte su función anticuerpo (es decir, que siga neutralizando la toxina diftérica), el soporte substancial de la función anticuerpo ha de poseer forzosamente un tamaño molecular menor que en estado nativo.

Esta conclusión plantea nuevos problemas con respecto a la validez del método de Ramon para valorar los digeridos. Volvemos a subrayar que el método de Ramon utiliza como indicador de la mezcla neutra (mezcla que contiene cantidades equivalentes de antígeno y de anticuerpo) la propiedad de ella de flocular antes que las restantes mezclas —antes que las que contienen menos anticuerpos que los necesarios para neutralizar los antígenos (que el método mantiene en cantidad fija en todas las mezclas), y antes también que las que contienen un exceso de anticuerpos—. Es decir, el anticuerpo en estado nativo parece ofrecer la propiedad notable de que cuando está en exceso solubiliza el precipitado inmune que da con su antígeno (o dificulta su aparición). Para que el método de Ramon pudiera aplicarse para valorar los digeridos habría que demostrar previamente que esta propiedad se conserva en los fragmentos de la antitoxina con función de anticuerpo.

Creemos, pues, que son muy objetables las valoraciones de antitoxinas efectuadas por los autores que trabajan con plasmas o sueros desnaturalizados por un método cualquiera si antes no han comprobado que el anticuerpo no pierde

(1) La defensa de esta opinión con ayuda de experimentos propios rebasa también el tema de esta comunicación. Aunque responda a las nociones dominantes en inmunología y la admitan autores muy prestigiosos, parece que algunos investigadores no la aceptan o, al menos, no la entienden debidamente.

por la desnaturalización la propiedad dicha, que es fundamental, como hemos visto, para que el método de Ramón proporcione resultados correctos. Resulta extraño, por ejemplo, que den por sentado que el método de Ramon sea viable para valorar sus sueros modificados, autores que creen observar que la digestión péptica acorta extraordinariamente el tiempo de floculación. A priori parece muy probable que la alteración del anticuerpo, que ello supone puede también traducirse en que el exceso del anticuerpo así alterado, no solubilice ya el precipitado que él mismo origina con su antígeno.

Como las dificultades expuestas en los apartados anteriores 1 y 2 hacen impracticable para nuestros propósitos el método de Ramón, no hemos estudiado si la demolición péptica destruye la coincidencia entre el «óptimo de floculación» y la «zona de equivalencia». Sin embargo, por analogía con lo estudiado en nuestro método, parece muy probable que el anticuerpo conserve tal propiedad y, además, que los floculados cuya aparición inmediata señalan muchos autores sean precipitados no inmunes del tipo de los estudiados en 1 y 2.

II

En vista de la imposibilidad de aplicar el método de Ramon cuando se desea valorar los anticuerpos antidiftéricos en plasmas (o en sueros, o en mezclas de seroglobulinas) que han sufrido una digestión péptica, intentamos establecer una variante de este método de valoración por floculación que llene dicha exigencia; la siguiente técnica da, como veremos, resultado satisfactorio.

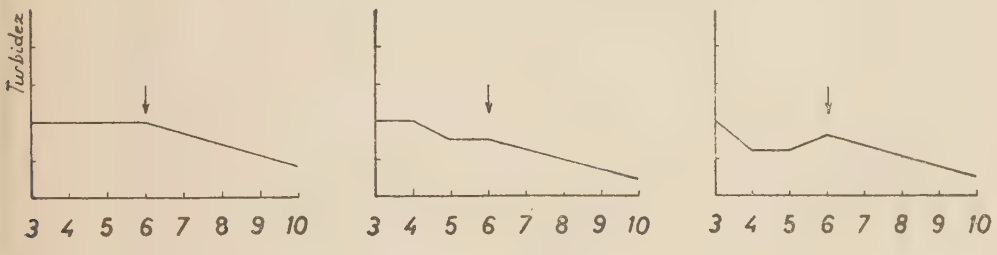
Modo de efectuar la determinación.—En una serie de tubitos de ensayo de unos ocho milímetros de diámetro, lo más iguales posible, se distribuyen cantidades crecientes de plasma (suero, etc.) que normalmente difieren de la anterior en 0,01 ml; hay que procurar, naturalmente, que el tubo primero contenga los anticuerpos en defecto y el último en exceso (con respecto a la cantidad fija de toxina que en su momento se añadirá a cada tubo), es decir, la serie, una vez que se hagan las mezclas, debe rebasar por ambos lados la zona de equivalencia. En todos los tubos se completa con agua destilada (1) un volumen igual al mayor de plasma (el introducido en el último tubo).

(1) En un principio, para evitar un arrastre variable de substancia inespecífica por los precipitados inmunes, se pensó sustituir la dilución con agua por la dilución con plasma equino normal, de modo que la concentración de seroproteínas normales se mantuviera constante en la serie. La precaución resulta superflua (por ejemplo, un plasma nos dió valorado diluyendo con agua, 121 U. f., y con plasma, las mismas 121 U. f.). El perfil de las gráficas de turbidez de los tubos es el mismo para las dos series, lo que demuestra que se trata siempre de precipitados inmunes con escaso arrastre de producto inespecífico.

Se añade a cada tubo 0,5 ml de toxina de Lf conocido, después de llevada al pH que posea el plasma problema. Se añade la cantidad de alcohol de 96 por 100 necesaria para que, una vez recibida, el total contenga un 8 por 100 de alcohol puro (1); esta cantidad se calcula sin más que multiplicar el volumen de la mezcla por 0,09 (2).

Se calientan los tubos a 40° durante quince minutos e inmediatamente puede observarse la escala de turbidez que ofrecen (si, por tratarse de plasmas muy pobres, no se apreciara bien la escala, puede guardarse la serie en nevera hasta el día siguiente), cuidando siempre de agitar antes de efectuar la observación.

En la serie de mezclas de un ensayo así fectuado, siempre que, como se dijo, comprenda la zona de equivalencia (condición naturalmente tan necesaria en nuestro método como en cualquier otro) se observa, examinando simultáneamente todos los tubos, lo siguiente: a partir del tubo que contiene menos anticuerpos crece paulatinamente la turbidez, hasta llegar a un determinado tubo (primer máximo); en los tubos siguientes o se mantiene la turbidez o disminuye para luego volver a subir repetidas veces, formando una serie de máximos y mínimos que, en ocasiones, alcanzan, o incluso sobrepasan, la del primer máximo. Lo observado se representa en las siguientes gráficas, perfectamente típicas, según nuestra extensa experiencia:



Gráfica 2.—En ordenadas se representa la turbidez de los tubos tomando como unidad arbitraria la del tubo que contiene menor cantidad de plasma; en abcisas, los ml. de plasma contenidos en cada tubo. En cada tubo el plasma está mezclado con 0,5 ml. de toxina diftérica con 20 Lf/ml. Las flechas señalan los tubos de mezcla neutra (zona de equivalencia).

---

(1) Esta concentración de alcohol es la máxima que no produce nada de precipitado ni con el plasma ni con la toxina *por separado;* es decir, que no origina, prácticamente, precipitados no inmunes. Pensamos que el dato es de aplicación muy general, en primer lugar porque la composición de los plasmas es muy constante y la proporción de ellos en la mezcla relativamente baja, y en segundo, porque en las toxinas manejadas por nosotros se requiere para que se enturbien que el alcohol se añada hasta mucha mayor concentración (al 26 por 100).

(2) En general, si se dispone de alcohol de graduación a, hay que multiplicar el volumen de las mezclas por $\frac{8}{a-8}$.

La zona de equivalencia, es decir, el lugar de la mezcla que contiene los anticuerpos que neutralizan justamente —sin defecto ni exceso— los Lf de toxina medidos en cada tubo, corresponden al tubo del primer máximo.

Estudio crítico del método.—Hemos comprobado la validez del método, tanto general como en particular, para valorar los digeridos pépticos.

1. Para ello, en primer lugar, hemos efectuado numerosas determinaciones del título de antitoxinas del mismo plasma, siguiendo en todas el método anteriormente descrito. En alguna serie hemos determinado el mismo plasma, puesto siempre en las mismas condiciones (estado nativo, sin digerir, pH neutro), variando únicamente de modo predeterminado su dilución, con el fin de apreciar la exactitud y sensibilidad del método. En otras series hemos comparado los resultados de valorar el mismo plasma 1. en condiciones ordinarias (estado nativo, pH neutro), 2. a pH ácido (plasma y toxina a pH 3,1, 2,7, 2,6, 2,1), 3. después de llevado a pH ácido y devuelto a las condiciones de neutralidad. Nuestras conclusiones han sido las siguientes: la valoración por nuestro método es posible en medio ácido y, además, los resultados, en los tres casos se repiten de modo perfectamente satisfactorio. Por ejemplo, una muestra de plasma utilizado para efectuar este estudio ofrece los siguientes valores al determinar en él las antitoxinas por nuestro procedimiento:

En condiciones normales,	dilución	1.ª	126	U. f.
íd.	íd.	2.ª	118	»
íd.	íd.	3.ª	116	»
íd.	íd.	4.ª	124	»
En medio ácido (pH 3,1),	dilución	1.ª	124	»
íd. íd.	íd.	2.ª	124	»
Llevado a pH 2,1 y devuelto a pH 7,0		... ...	104	»
íd. 2,7	íd.	... ...	119	»
íd. 3,1	íd.	... ...	109	»

2. En segundo lugar se compararon los resultados obtenidos por nuestro método y por el de floculación de Ramon, valorando por uno y otro plasma puesto en varias condiciones. He aquí los resultados:

Ensayo primero.—La valoración de un mismo plasma en condiciones ordinarias dió los siguientes resultados:

Por el método de Ramon,	valoración	1.ª	96 U. f.	Promedio
íd.	íd.	2.ª	126 »	111 U. f.
íd.	íd.	3.ª no flocula.		

Por nuestro método,	valoración 1.ª	111 U. f.		
íd.	íd. 2.ª	100 »	Promedio	
íd.	íd. 3.ª	111 »	105 U. f.	
íd.	íd. 4.ª	100 »		
íd.	íd. 5.ª	100 »		

Ensayo segundo.—La valoración de otro plasma, en condiciones ordinarias y en medio ácido, dió por ambos procedimientos:

Por el método de Ramon,	pH 7,0	valoración 1.ª	126 U. f.		
íd.	íd.	íd. 2.ª	105 »	Promedio	
íd.	íd.	íd. 3.ª	114 »	115 U. f.	
íd.	pH 3,0 no flocula.				
Por nuestro método,	pH 7,0,	valoración 1.ª...	126 U. f.		
íd.	íd.	íd. 2.ª...	118 »	Promedio	
íd.	íd.	íd. 3.ª...	116 »	120 U. f.	
íd.	pH 3,0,	íd. 1.ª...	124 »	Promedio	
íd.	íd.	íd. 2.ª...	124 »	124 U. f.	

De la comparación se deduce lo siguiente: 1. Nuestro método, cuando se opera con plasma puesto en el intervalo de pH en que es viable el de Ramon (condiciones ordinarias), da resultados prácticamente coincidentes con los de éste; obsérvese a este respecto que la determinación según el método de Ramon da al primer ensayo un valor más alto y en el segundo un valor más bajo que los correspondientes obtenidos por el nuestro. 2. En dichas condiciones ordinarias, nuestro método resulta más sensible que el de Ramon (en el primer ensayo no se apreciaron los precipitados inmunes con el método de Ramon a diluciones del plasma que permiten aún valorar perfectamente con nuestro método); también parece que nuestro método es más exacto (desviación típica de cada determinación: para nuestro método, 4,7 U. f.; para el de Ramon, 13,0). 3. Nuestro método permite valorar en condiciones en que resulta imposible conseguirlo con el de Ramon; y 4. Por último, es más cómodo que éste porque sustituye la vigilancia durante un tiempo, a veces prolongado, para apreciar la primera floculación, por una observación momentánea de la serie a un tiempo elegido.

3. Para terminar, el método expuesto permite determinar los anticuerpos en los digeridos pépticos del plasma (o suero) antidiftérico. Para llegar a esta conclusión hemos tenido que comparar los resultados por él obtenidos con los del método de Ehrlich (neutralización del efecto letal de la toxina para el coba-

yo) (1); no hemos podido comparar con el de Ramon, que, como hemos visto, es impracticable para valorar tales digeridos; es evidente, por otra parte, que tampoco puede utilizarse como referencia la determinación del plasma nativo que se digiere, ya que la digestión destruirá una proporción de anticuerpos indeterminada a priori. La comparación de la pérdida por digestión péptica, apreciada por nuestro método y por el de Ehrlich, resulta, como hemos dicho, satisfactoria; por ejemplo, en un caso se partió de 250 ml de plasma de 126 Uf/ml, de ellos se obtuvieron 30,7 g. de una fracción globulínica con 814 Uf/g., que después de someterlos a digestión péptica rindieron 230 ml. de un producto con 90 Uf/ml. Valorados simultáneamente los tres productos por el método de Ehrlich, se obtuvieron como resultados, respectivamente, 145, 879 y 104 unidades de Ehrlich/ml. Es decir, que las pérdidas que da nuestro método, 21 y 17 por 100, coinciden de modo satisfactorio con las correspondientes de 25 y 12 por 100 que da el método de Ehrlich, que, en definitiva, expresa directamente la eficacia para la aplicación terapéutica de las antitoxinas con que se trabaja.

RESUMEN

I. Se exponen las dificultades insuperables para valorar los anticuerpos antidiftéricos en digeridos ácidos de plasma (suero, seroglobulinas) por el método de floculación de Ramon.

II. Se describe y estudia críticamente un nuevo método, que permite determinar, rápidamente y con suficiente precisión, tales anticuerpos, después de someter los productos que los contienen a digestión péptica.

(1) Hemos seguido para estas valoraciones las normas que precisa el manual de A. B. Wadsworth, 1947, Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health, 654-656.

INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROBIOLOGIA DE MADRID
C. S. I. C.

EL METODO DEL ASPERGILLUS NIGER PARA LA DETERMINACION DE ELEMENTOS EN SUELOS

I. PUESTA A PUNTO DEL METODO PARA DETERMINACIONES DE MAGNESIO

por
Manuel Ignacio Candela Martínez.

FUNDAMENTOS DEL METODO

Base fisiológica.

Es sabido que los microorganismos necesitan para su vida, crecimiento y reproducción, de determinadas substancias, y que muchos de ellos precisan, en cantidades considerables, compuestos inorgánicos de los que los suelos están ricamente provistos. De aquí que haya sido preocupación reiterada el utilizar algunas especies de hongos y bacterias que dieran con su crecimiento una idea del contenido del medio en que se desarrollaban. Entre todos los microorganismos, el hongo Aspergillus niger (estirpe M de Mulder), necesita para su normal crecimiento los siguientes elementos minerales: nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, azufre, hierro, zinc, cobre, manganeso, molibdeno y, posiblemente, níquel, vanadio, cobalto y galio. Está claro que si omitimos en una solución de cultivo que contenga, desde luego, una substancia del tipo de los hidratos de carbono como fuente de energía, uno de estos elementos esenciales, el crecimiento del hongo se reducirá sensiblemente y, por otro lado, la adición de cantidades crecientes del elemento a estudiar que vayan desde contenido deficiente a suficiente producirán paralelamente un incremento en el peso del micelio seco obtenido, así como una variación en la esporulación del hongo. De aquí se desprende, lógicamente, que es preciso utilizar productos químicos de alto grado de pureza que proporcionen soluciones de cultivo de toda garantía, ya que la sensibilidad del hongo acusa estas mismas impu-

(*) Trabajo presentado en la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 18 de febrero de 1952.

Está en curso la extensión del presente método a la determinación de K, P, Fe, Cu, Zn, Mn y Mo en suelos, que esperamos poder publicar en plazo breve.

rezas, y, aun en estas condiciones, es necesario efectuar un proceso de purificación, incluso en el caso de trabajar con productos para análisis.

A este efecto, se han sugerido dos métodos diferentes: uno, que utiliza resinas cambiadoras de iones, y otro meramente químico. Respecto al primero, consideramos difícil su realización, dado, por otra parte, que no es sencillo adquirir dichas resinas en la actualidad. En cuanto al segundo, haremos una exposición en el curso de este trabajo.

El plan utilizado consiste en determinar el peso de los micelios secos obtenidos añadiendo cantidades conocidas crecientes del elemento a determinar a una serie de matraces erlenmeyer de litro, que contienen idénticas cantidades de los otros elementos esenciales para el crecimiento del Aspergillus niger. De esta forma se consigue paralelamente un desarrollo creciente del hongo, que se manifiesta al pesar el micelio seco. Con los pesos de micelio obtenidos, se construye una gráfica, expresando en coordenadas cartesianas las cantidades de los elementos variables y el peso del micelio seco. Posteriormente, para determinar el contenido de un suelo o de cenizas de plantas basta suministrar a la solución de cultivo una cantidad conocida de este suelo o planta en lugar del elemento en cuestión, y más tarde, conociendo el peso del micelio, obtenido de esta forma, se pasa a la curva y se conoce así la cantidad que buscamos.

Trabajos anteriores.

En el año 1909, Butkevic y Kosceleckii introdujeron métodos biológicos de determinación de elementos inorgánicos en suelos por medio de hongos del género Aspergillus y, posteriormente, una serie de investigadores han desarrollado este mismo método utilizando otros microorganismos. Actualmente está comprobado que por su sensibilidad frente a la riqueza en oligoelementos del medio de cultivo, por las características mecánicas y físicas del micelio y por la sencillez de su cultivo, el Aspergillus niger, en determinadas estirpes, resulta el más apropiado para la determinación de elementos minerales en suelos.

Ha sido Mulder, en 1939, quien ha puesto en práctica un método biológico que no solamente tiene un interés científico y de investigación, sino una indudable aplicación frente a los métodos químicos colorimétricos y espectrográficos, ya que nos proporciona el contenido de los elementos diferentes de los suelos en estudio con una precisión que llega, en el caso de alguno de ellos, como el molibdeno, al orden de las centésimas de γ, y es esencialmente interesante porque suministra, no ya el contenido total, de escaso interés desde el punto de vista agrícola, sino las cantidades de dichos elementos que resultan asimilables por las plantas, proporcionándonos, por consiguiente, el estado actual efectivo en elementos y no, como ocurre en los métodos químí-

cos, el contenido independientemente de su situación, caso éste que puede fácilmente conducir a resultados desconcertantes y nocivos para los cultivos agrícolas.

Posteriormente a Mulder han sido desarrolladas en el extranjero una serie de experiencias con indudables resultados, principalmente en Holanda e Inglaterra, de tal manera, que en la actualidad podemos decir que el método ha sido bastante estudiado, y si Niklas en Alemania (1930) dió las normas que, poco más o menos, se vienen utilizando en la actualidad, por su parte, Steinberg (1935) proporciona las orientaciones para la purificación de las soluciones de cultivo, caso éste de gran interés porque presentan serias dificultades, dada la complejidad de los medios empleados. Nicholas en Long Asthon y Gerretsen en Gröningen nos proporcionan los trabajos más recientes en este aspecto.

En España, por nuestra parte, no conocemos que se haya efectuado ningún trabajo hasta el presente en el que se utilicen estos métodos para la determinación de elementos minerales en suelos y plantas, aunque es cierto que por algunos investigadores se utilizan los métodos biológicos para la determinación de aminoácidos y vitaminas.

PREPARACION DE LA SOLUCION NUTRITIVA

Composición.

Hemos utilizado las soluciones nutritivas propuestas por Nicholas y Fielding, la más completa de las cuales es como sigue:

Dextrosa	50 g.	$FeCl_3.6\ H_2O$	3 mg.
KNO_3	5 g.	$ZnSO_4.7\ H_2O$	2 mg.
NaH NaH_2PO_4	0,6 g.	$MnSO_4.4\ H_2O$	0,3 mg.
$MgSO_4$	1 g.	$Na_2MoO_4.2\ H_2O$	0,5 mg.
Ca $(NO_3)_2$	0,6 g.	$CuSO_4.5\ H_2O$	0,6 mg.

$Ca(NO_3)_2.8\ H_2O$	0,2 mg.
$Co(NO_3)_2.6\ H_2O$	0,1 mg.
$Ni(NO_3)_2.2\ H_2O$	0,08 mg.
$NaVO_3.4\ H_2O$	0,08 mg.

De esta solución se excluyen, naturalmente, los elementos que se vayan a determinar, que son suministrados bien por cantidades crecientes y conocidas de una sal de dicho elemento, con lo que obtendremos una gráfica que nos proporcionará la relación entre el crecimiento del hongo y el contenido de dicho elemento, o bien por la muestra del suelo o cenizas de hojas, que nos proporcionará, una vez llevado el peso del micelio obtenido a los datos

anteriores de la serie patrón, el contenido en dicho elemento de la substancia estudiada.

Las sales de la solución de cultivo deben ser, como hemos indicado, reactivos para análisis o productos purísimos, y se disuelven en un litro de agua bidestilada en vidrio pyrex.

Purificación.

Si la purificación es necesaria porque los productos de que se parta no sean de comprobada garantía, hemos de resolver dos problemas: primero, el de la dextrosa y los macroelementos (potasio, fósforo, magnesio, calcio), y segundo, los elementos-trazas, oligoelementos o elementos vestigiales.

Para purificar los macroelementos y le dextrosa se efectúa la solución de los mismos, exceptuando los fosfatos, que han de ser recristalizados previamente, y se les trata según normas establecidas.

Los elementos vestigiales se recristalizan una o dos veces, con lo cual se puede garantizar con bastante seguridad que no contienen cantidades apreciables de impurezas.

Para la eliminación del Mg de la solución básica de cultivo hemos encontrado que el método de más garantía consiste en utilizar las 8-hidroxiquinoleína (oxina) en solución alcalina de la siguiente manera: a una solución de sales minerales, en ausencia de fosfatos, incluyendo la dextrosa, se añaden cinco centímetros cúbicos de solución al 2 por 100 de oxina en ácido acético 2n, y después suficiente amoníaco para ajustar el pH exactamente a 8. La solución se coloca en una estufa a 33° durante veinticuatro horas. Después se filtra y se elimina el exceso de quinoleína mediante el lavado de la solución repetidas veces con cloroformo redestilado en porciones de 50 c. c. cada vez, y luego con éter redestilado, hasta tener la completa seguridad de la total eliminación de los productos tóxicos. Entonces se ajusta el pH a 5 con clorhídrico para análisis y se añaden los elementos vestigiales y el fosfato, previamente recristalizados, completando la solución hasta un litro con agua bidestilada. Es conveniente añadir algo de sulfato magnésico a la solución de macroelementos antes de la purificación, porque esto facilita la eliminación de los últimos vestigios presentes como impurezas.

Esterilización.

Las condiciones en que el *Aspergillus niger* ha de ser cultivado hacen que no sea precisa una esterilización, si es que la solución se utiliza al poco tiempo de ser preparada. Otro caso es cuando pasan algunos días desde que se prepara la solución hasta que se hace la inoculación y se verifica

Fig. 1.

Colonia de Aspergillus niger en agar-Czapek-glucosa (30 g /l.), pH = 6-7. Cultivo en porta. Examen directo con objetivo seco.

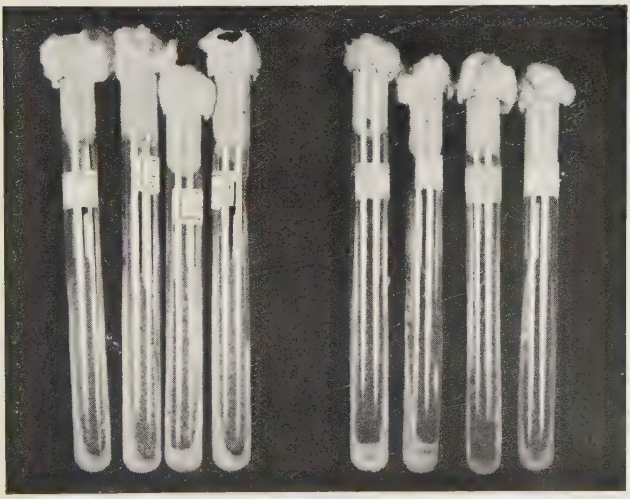


Fig. 2.

Los cuatro tubos de la izquierda son de cultivos de Aspergillus niger incubados a 25°, durante cuatro días, en medio agar-malta, y los de la derecha, cultivados en las mismas condiciones con agar-malta-dextrosa-peptona.

el ensayo. En este caso, una esterilización en autoclave a 115° durante quince minutos es suficiente para efectuar el ensayo, no siendo necesario, por otro lado, un gran cuidado para evitar contaminaciones durante el desarrollo del trabajo.

CULTIVOS

Preparación de la suspensión de esporas.

Hemos utilizado en nuestro trabajo estirpes de Aspergillus niger M de Mulder, traídas de Inglaterra y Holanda, y que fueron subcultivadas previamente en tubos inclinados de agar-malta-dextrosa, según la siguiente composición:

Extracto de malta	20 g.
Peptona	1 g.
Dextrosa	20 g.
Agar	20 g.
Agua	1.000 c. c.

Como puede verse en la figura 2, la producción de esporas es sensiblemente mayor utilizando este medio en vez del que tradicionalmente se usaba, y cuya composición era:

Extracto de malta	25 g.
Agar	20 g.
Agua	1.000 c. c.

De esta forma conseguimos, en primer lugar, disminuir el tiempo de incubación, y, en segundo lugar, una mayor facilidad para obtener una suspensión de esporas lo suficientemente densa como es necesaria.

Es preciso, sin embargo, tener un gran cuidado en la preparación de esta suspensión, pues es fácil arrastrar partículas de micelio o incluso trozos del agar en el que ha crecido el Apergillus, y, en ese caso, se introducen fácilmente errores en los resultados. Por ello, es muy interesante utilizar tubos inclinados de agar-malta-peptona, en los que el crecimiento del hongo es abundante y resulta muy fácil recoger las esporas de la parte alta con el asa de platino, sin necesidad de tocar las partes bajas del micelio ni el medio de cultivo.

La preparación de la suspensión de esporas se efectúa como sigue: se subcultiva la estirpe adecuada de Aspergilus niger en tubos inclinados de agar-malta-peptona durante unos seis días a 32°, y con un asa de platino se recogen las esporas, que se pasan a una cantidad de agua bidestilada estéril de unos diez centímetros cúbicos, aproximadamente, hasta obtener una

suspensión de esporas abundante, de forma que el líquido de la misma parezca negro. Cuatro o cinco gotas de esta suspensión son suficientes para cada matraz en que se haga el cultivo.

Condiciones de cultivo.

Las series patrón se preparan tomando 50 c. c. de la solución básica para matraz Erlenmeyer de litro, a los que se añaden unas cuatro gotas de la suspensión de esporas y las contidades crecientes de la sal del catión que queremos determinar. En el caso del Mg, estas series se forman de la siguiente manera: en el primer matraz no se pone ninguna cantidad de Mg.; en el segundo, 25 γ ; en el tercero, 50, y en los sucesivos, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 800 y 1.000 γ de Mg, respectivamente. Los matraces se tapan con vasos de 50 c. c. invertidos sobre el cuello, en lugar de utilizar tapones de algodón. De esta forma se reduce el riesgo de contaminaciones metálicas y es suficiente para evitar las contaminaciones con otros microorganismos. Más tarde, se incuba durante seis días a 32° C.

Variación del pH con el crecimiento.

El mayor desarrollo del hongo ha de producir forzosamente una mayor formación de ácidos, como el cítrico, y, por consiguiente, sería lógico pensar

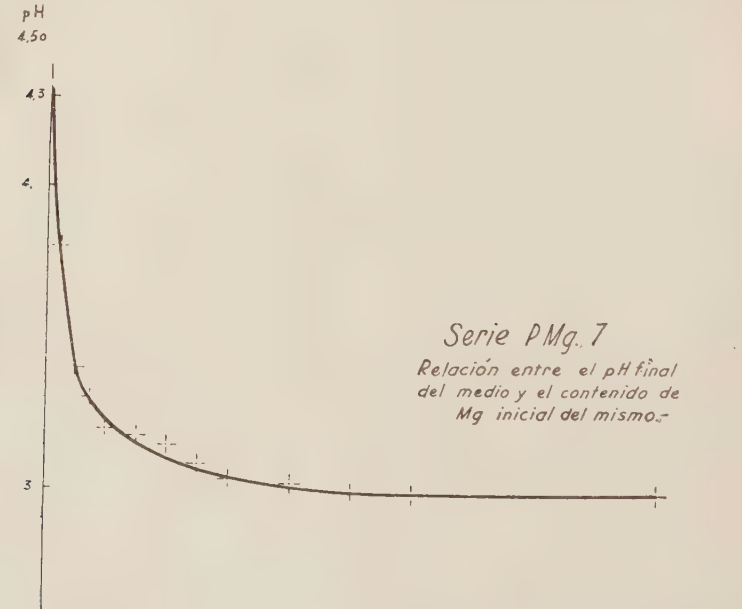

pH
4,50
4,3
4.
3
2,50
Serie PMg. 7
Relación entre el pH final del medio y el contenido de Mg inicial del mismo.-
25 50 75 100 150 200 250 300 400 500 600 700 800 1000
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
γ Mg.
Nº5

Fig. 3.

que hay una correlación absoluta entre el contenido creciente del metal en cuestión, desarrollo del hongo y pH decreciente del medio al final del cultivo. Por eso resulta interesante determinar la acidez de la solución empleada después de efectuado el ensayo, observando que hay una absoluta periodicidad en aquellas tres variables. La curva adjunta muestra esta variación en las experiencias hechas por nosotros.

Después de los seis días de cultivo, y antes de interrumpir el crecimiento del hongo añadiéndole un líquido esterilizante, se debe determinar el pH de cada matraz para conocer la variación del mismo.

Secado y peso.

Una vez determinado el pH, que debe hacerse con la mayor exactitud, se saca el micelio de los matraces y se lava cuidadosamente con agua del grifo, hasta tener la seguridad de que no quedan adheridas gotas de la solución. Ha de cuidarse muy especialmente de seguir un mismo criterio en el lavado de todos los matraces de la serie, con el fin de no introducir errores por diferencias de tratamiento. Una vez lavados y puestos en los mismos vasos que cubrían los matraces, los micelios se pasan a una estufa, donde se tienen durante unas doce horas a 55°, y después otras dos horas más a 105°. Una vez fríos, se pesan y se construye una gráfica, tomando en ordenadas el peso del micelio seco en mg. y en abscisas, el contenido en el metal estudiado por cada 50 c. c. de disolución.

ANALISIS DE SUELOS

Habiendo llegado a una serie de experiencias en las cuales los resultados sean concordantes dentro de ciertos límites, y construídas con ellas las curvas de relación entre el crecimiento del hongo y el contenido del catión a estudiar, se pasa al estudio de la situación en dicho elemento de algunas muestras de suelo.

Toma de muestras y preparación de los suelos para el análisis.

Siendo preciso tomar cantidades pequeñas de suelo para las determinaciones, es altamente importante que las muestras se tomen a partir de un buen número de diferentes sitios en el campo (por ejemplo, 10 ó 20 por hectárea) y que se mezclen bien. Todas las muestras se deben secar en aire y las de arcilla molerse bien, hasta un tamaño muy fino. Las de arena, se tamizan en un cedazo de acero, exento de robín, con mallas de dos milímetros. Las piedras y partículas groseras deben eliminarse, pero han de ser tomadas en cuenta para efectuar el cálculo de la cantidad total del elemento a investigar.

Es interesante tomar las muestras de suelo para este tipo de ensayo, de los sitios cercanos a plantas en crecimiento, preferentemente de las zonas de raíces, y es muy importante disponer de muestras cercanas a plantas normales y a otras afectadas por deficiencias, ya que, de esta forma, las diferencias en el estado de oligoelementos de dichos suelos son, probablemente, más ostensibles que las que aparecerían si la toma de muestras se hace por los métodos habituales.

Una vez el suelo en condiciones para verificar el ensayo, se prepara una serie de matraces que contengan 50 c. c. de la solución de cultivo, exenta por completo del metal a investigar, y en ellos se introduce una cantidad conocida, pesada exactamente, de suelo, preferiblemente un gramo. Entonces se cultiva en las mismas condiciones utilizadas para las series patrón y, posteriormente, se lava, seca y pesa de igual manera, llevando estos datos a la curva patrón, obtenida previamente, donde, por interpolación, podemos determinar el contenido de dichos suelos en el metal asimilable.

Es mucho mejor efectuar estos ensayos por duplicado o tripilcado para cada muestra, tomando como buenos los más concordantes.

Estudio específico del ensayo para el magnesio.

Dámos a continuación una idea de los resultados obtenidos en la puesta a punto del método para la determinación de Mg en suelos y plantas.

La purificación de la solución de cultivo se efectuó, como indicábamos antes, utilizando la 8-hidroxiquinoleína, que nos proporcionó espléndidos resultados, ya que pudimos obtener, como se demuestra en las fotografías adjuntas, una mayor exactitud, y, desde luego, un crecimiento prácticamente nulo en el ensayo en blanco con 0 γ de Mg.

Sin embargo, nuestros resultados difieren ligeramente de los observados en trabajos anteriores, ya que si bien hay una absoluta periodicidad en el peso del micelio, no la hay en el aspecto del mismo ni en la producción de esporas. En todos nuestros ensayos la esporulación es más intensa que en lo comunicado por Nicholas y Fielding. Ellos no aseguran que en la prueba en blanco (0 γ de Mg) no se produzca crecimiento; nosotros lo hemos obtenido nulo en todos los casos.

Respecto al bioensayo de suelos, obtuvimos muy poca concordancia con los resultados logrados por la Sección de Análisis del Instituto de Edafología para estos mismos suelos, si bien es cierto que el *Aspergillus* acusa la presencia solamente del Mg disponible, y que dicha disponibilidad depende de diferentes factores, especialmente del tipo de suelos.

Por todo esto, solamente se puede encontrar un consejo de valor en las experimentos de campo, en diferentes tipos de suelos, haciendo un estudio com-

binado entre el aspecto de los cultivos en lo que se refiere a su estado en elementos nutritivos y los resultados obtenidos con el método a que se refiere este trabajo.

Es necesario, pues, para tener plenas garantías de éxito, hacer un trabajo en el que se apliquen a los suelos cantidades crecientes del elemento en cuestión; en este caso, en forma de sulfato magnésico, y observar si los resultados obtenidos tienen recíproca correlación con los del método del Aspergillus.

La figura 4 representa la curva patrón que relaciona el contenido en Mg de la solución de cultivo y el peso del micelio después de seis días en estufa a 32°.

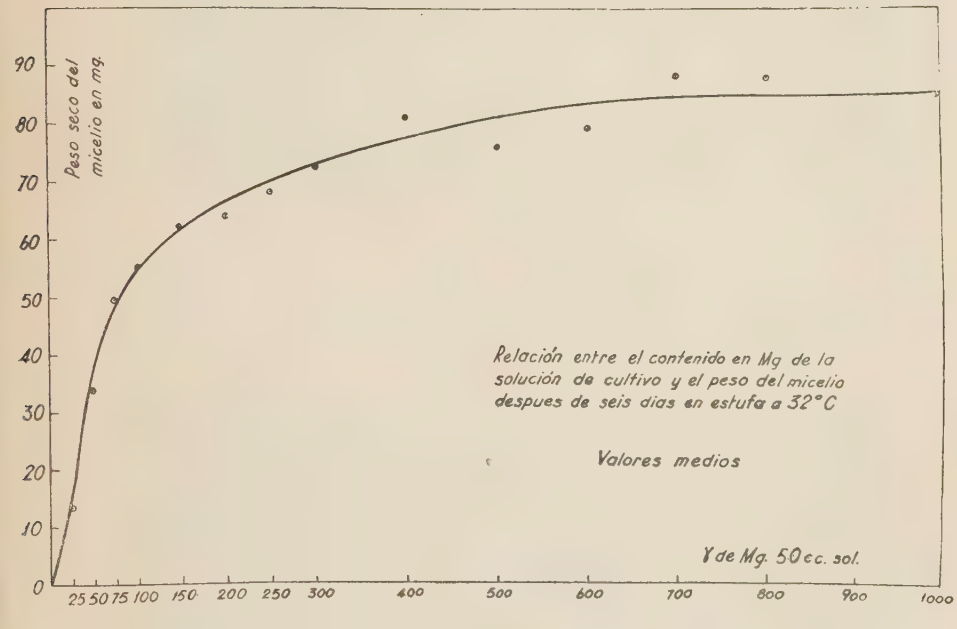

Peso seco del micelio en mg.
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Relación entre el contenido en Mg de la solución de cultivo y el peso del micelio despues de seis dias en estufa a 32°C
Valores medios
γ de Mg. 50 cc. sol.
25 50 75 100 150 200 250 300 400 500 600 700 800 900 1000

Fig. 4.

En las figuras 5, 6, 7 y 8 se puede observar la variación del crecimiento y esporulación del micelio con cantidades crecientes de Mg. De esta forma, en la figura 5 el contenido por cada 50 c. c. de solución es en γ de Mg como sigue: de izquierda a derecha, 0,25 y 50. En la figura 6, y por el mismo orden, 75, 100 y 150. En la figura 7, de derecha a izquierda, 200, 250 y 300. Y, por último, en la figura 8, y también de derecha a izquierda, 400, 500 y 600.

DISCUSION

El problema fundamental que presenta el método biológico de determinación de suelos por medio del Aspergillus niger es, desde luego, el de

la purificación de la solución de cultivo, hasta conseguir dejarla absolutamente libre de los respectivos elementos a estudiar. Los métodos utilizados normalmente, incluyendo el que emplea resinas cambiadoras de iones y el que utiliza un fundamento químico, agudizan aún más la complejidad del problema, asociándola con la preparación de los medios para trabajos con cultivos puros. Si no se lleva un extremo cuidado en la preparación de esta solución, es muy posible que en ella se hallen presentes cantidades suficientes de impurezas para suministrar lo necesario al Aspergillus niger en su crecimiento. Así, en el caso del molibdeno, como el hongo puede detectar diferencias de 0,0001 γ y el límite de sensibilidad de los reactivos químicos es 0,1 γ por 50 c. c., es problema casi insoluble obtener dicha purificación.

La extrema sensibilidad del método para la determinación de algunos elementos minerales en suelos necesita del máximo cuidado en la limpieza, preparación y características de las vasijas de vidrio, que deben ser de la mejor calidad, así como el agua que se emplee, que ha de ser destilada en vidrio, siendo obvio que todos los materiales han de manejarse con extremada limpieza y precaución.

Los límites efectivos en que el método se desenvuelve, dados en γ por 50 c. c. de solución de cultivo, son:

Mg: 25 a 500. K: 500 a 10.000. P: 500 a 10.000. Fe: 0,1 a 20. Zn: 1 a 10. Mn: 0,01 a 10. Cu: 0,05 a 5; y Mo: 0,0001 a 0,05.

Hay otros criterios, aparte del peso, que nos dan con alguna aproximación el contenido de los elementos existentes; sin embargo, hay une serie de factores internos que influyen, indudablemente, en estos síntomas. Así, en el caso del Mg, se ha tomado como criterio para juzgar su contenido el aspecto del micelio y la abundancia de esporas en su cubierta. En el caso del Fe y el Cu, los distintos tonos de color de los mismos. Sin embargo, nosotros no le damos excesiva importancia a ello, dado que no hemos podido comprobar una correlación y reiteración aceptables.

Algunos investigadores extranjeros dan, por otro lado, gran importancia al tratamiento previo del suelo y a su esterilización, habiendo podido observar nosotros que no existe influencia muy notable en este sentido. Así pues, no se nos han presentado contaminaciones en ninguno de los suelos ensayados con la suficiente importancia como para influir en el desarrollo del método dentro de los límites permisibles en el mismo.

El pH de los suelos influye, como es sabido, de manera notable en la disponibilidad de los elementos minerales que él contiene. A pesar de la sensible periodicidad, que nosotros hemos observado, en la variación de la acidez de la solución de cultivo con el crecimiento del hongo, no se puede utilizar —y esto es lamentable— esta magnitud para la determinación del contenido en elemen-

Fig. 5.

Fig. 6

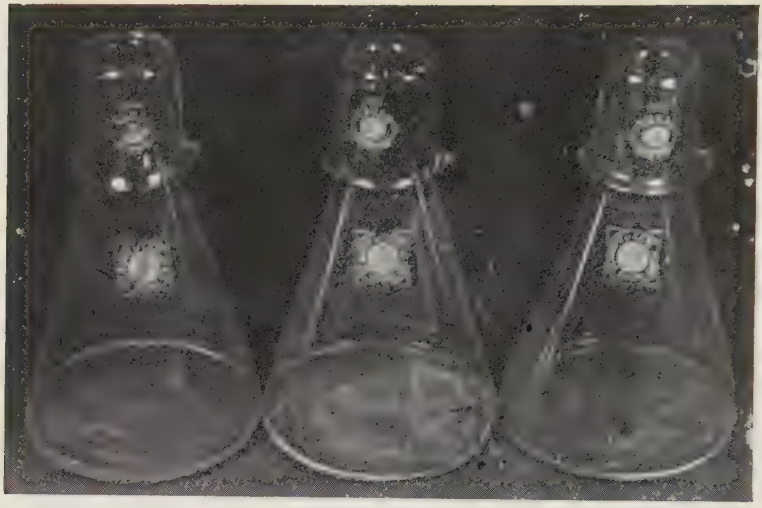


Fig. 7.

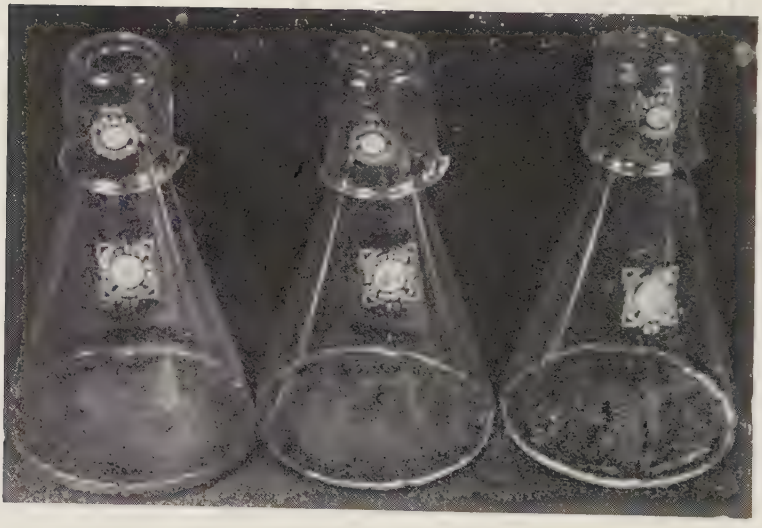


Fig. 8.

tos minerales asimilables en el suelo que se estudie, dado que éstos variarán en su disponibilidad con el pH inicial del suelo.

Por las razones dichas anteriormente, es necesario ajustar previamente el pH inicial de la solución de cultivo, porque, de esta forma, se capacitará al hongo de manera más idónea para la extracción de los elementos de que se trate.

Las desventajas principales que tiene este método son, aparte de la excesiva duración de los ensayos, el peligro de que se presenten mutaciones o variaciones al hongo y las posibilidades de obtener diferentes resultados: 1.º, por el uso de diferentes estirpes del microorganismo, y 2.º, por la variación posible del contenido de la solución de cultivo, ya de por sí bastante complicada. En nuestro caso, estos dos inconvenientes se han reducido al mínimo al utilizar siempre la misma cepa de Aspergillus niger, recibida de Long Asthon (Inglaterra) y porque realizamos con el mayor cuidado la preparación de las soluciones de cultivo.

A continuación, en la tabla siguiente, damos algunos datos numéricos de los resultados obtenidos en cierto número de ensayos de suelos para Mg, realizados por nosotros:

ENSAYO DE MAGNESIO EN SUELOS

Núm.	Muestra	pH	Peso mic.	Anál. quím.	Anál. biol.	Observaciones
1	238-IV	2,55	0,6448			Micelio total con bastantes esporas.
2		2,3	0,7009	10,03	185	Micelio delgado, bastantes esporas.
3		2,32	0,6793			Micelio blanco, zonas esporuladas.
4	239-V	2,3	0,4794			Manchas blancas, muchas esporas.
5		2,3	0,4576	7,61	65	Micelio blanco, bastantes esporas.
6		2,3	0,4087			Micelio delgado, pocas esporas.
7	240-I	2,5	0,3830			Micelio delgado, todo negro.
9		2,4	0,3566	4,42	50	Manchas blancas, fondo negro.
8		2,3	0,4036			Todo esporulado.
10	242-V	3,7	0,4043			Micelio blanco, pocas esporas.
12		3,9	0,4410	0,45	50	Rodales blancos, fondo negro.
11		3,6	0,5844			Cubierta total, áreas blancas.
13	156	2,4	0,3129			Micelio casi cubierto de esporas.
14		2,38	0,2979	75	46	" " " "
15		2,44	0,3021			" " " "
16	158	2,45	0,2983			Micelio total, bastante espeso.
17		2,4	0,2365	150	40	Micelio total, bastantes esporas.
18		2,39	0,2876			" " " "
19	232-II	2,4	0,2551			Micelio delgado, pocas esporas negras.
20		2,45	0,2278	35	34	Micelio total, pocas esporas.
21		2,5	0,2361			Micelio tenue, pocas esporas.
22	235	3	0,2830			Micelio total, todo esporas.
23		2,9	0,2971	240	46	Cubierta parcial de esporas.
24		3,1	0,2883			Cubierta completa de esporas.

Notas.—El pH fué determinado al cumplirse el tiempo prescrito para el cultivo. El análisis químico de las cuatro primeras muestras (238-IX, 239-V, 240-I y 242-V) viene expresado en % en MgO. El de las cuatro últimas (156, 158, 232-II y 235) viene dado en Kg. de Mg. por hectárea de terreno. El análisis biológico, en γ de Mg. por g. de suelo.

RESUMEN

1) Se utilizó la estirpe M de Mulder de Aspergillus niger como ensayo biológico para la determinación del Mg y otros elementos, resultando la respuesta de dicho hongo específica y cuantitativa.

2) La sensibilidad del método para el caso del Mg se ha comprobado varía entre 25 y 500 γ.

3) Se ha utilizado como criterio cuantitativo únicamente el peso del micelio seco, aunque en el caso de las soluciones patrones se ha observado una perfecta periodicidad en la variación del pH con el contenido de Mg de las soluciones.

4) Ha sido desarrollado un método para dejar libre de Mg la solución de cultivo empleada en los ensayos, totalmente satisfactorio.

5) No se han encontrado interferencias con otros microorganismos, habiendo ensayado la necesidad de la esterilización previa de suelos y soluciones.

6) El ensayo para suelos dió resultados satisfactorios, aunque no sean concordantes con los análisis químicos de los mismos, si bien los obtenidos por el método biológico proporcionan una mayor seguridad a la hora de determinar los requerimientos de sales minerales de los suelos de cultivo.

7) Se puede sugerir la utilización, en condiciones análogas, de otro tipo de microorganismos, sean hongos o bacterias, y sería interesante emplear algunas estirpes caracterizadas en suelos españoles.

SUMMARY

In the present paper a study is initiated about the application of the Aspergillus niger method to the determination of mineral elements in agricultural soils. Some observations and modifications on the already published literature are given.

BIBLIOGRAFIA

ACOCK, A. M. 1941. An examination of Mulder's rapid biological method for estimating the amount of copper in soils. **J. Aust. Coun. Sci. and Ind. Res,** 14: 288-300.

ALBERT, A. 1947. 2. Derivatives of oxine (8-hydroxyquinoline). **Ibid.,** 41, 4: 534-545.

ALISOPP, A. 1937. The formation of oxalic acid by Aspergillus niger. **New Phytol,** XXXVI: 327-56.

BARTON WRIGHT, E. C. 1945. The theory and practice of the microbiological assay of Vitamin B complex; together with assay of selected amino acids and potassium. **Analyst.,** 70: 283.

BENECKE, W., and **SODING, H.** 1927. Beitrage zum Ausbau der mikrobiologischen Bodenanalyse. **Z. Pflanzenernähr. u. Düng.,** A, 10: 129-159.

BENNET-CLARK, T. A. and **LA TOUCHE, C. J.** 1935. The utilisation of organic acids by Aspergillus niger. **«New Phyfol»,** XXXIV: 211-31 (108, 109).

BENTLEY, O. G., SNELL, E. E. and **PHILLIPS, P. H.** 1947. A microbiological method for the determination of manganese. **J. Biol. Chem.,** 170: 343.

BERTRAND, D. 1942. Vanadium, an olisynergic element for Aspergillus niger. **C. R. Acad. Sci. Paris,** 213: 254-257.

——— 1942. Sur l'extraordinaire sensibilité de l'Aspergillus niger vis à vis du manganèse. **Bull. Soc. Chim. France,** IV: 11. 400.

——— 1941. Importance of the trace elemente vanadium for Aspergillus niger. C. R. Acad. Sci. Paris, 213: 254-257.

——— and **JAVILLIER.** 1911. Influence du manganèse sur le développement de l'Aspergillus niger. **C. R. Acad. Sci. Paris,** 152: 225.

BORTELS, H. 1930. Molybdän als Katalysater bei der biologischen Stickstoffbindung. **Arch. Microbiol.,** 1: 333-342.

BUTKEVIC, W. 1909. The cultura of the fungus Aspergillus niger as a method of soil investigation. **Russ. J. Exp. Agric.,** 10: 136-141.

CHRISTIENSEN, H. R. 1906. Om nyere Principper i Jordbundsforskningen. Samt nogle Meddelelser om Azotobacter chroococum's Forekomst og Udbredelse i forskellige Jorder. **Tiddskr. Landbr. Planteavl.,** 13: 145-194.

FOSTER, J. W. 1939. The heavy metal nutrition of fungi. **Botan. Rev.,** 5, 4: 207-239.

GERRETSEN, F. C. 1948. On the use of Aspergillus niger for the determination of plan nutrients in soils. **Anal. Chim. Acta,** 2: 782-792.

GOLLMICK, F. 1936. Der Einfluss von Zinc, Eisen un Kupfer und deren Kombination auf das Wachstum von Aspergillus niger. **Zbl. Backt.** II. 93,421.

KOCH, G. P. 1918. Potassium requirements of bacteria. **Soil Science,** 5: 219-224.

McLEAN, H. C. 1918. The oxidation of sulfur by microorganisms in its relation to the availability of phosphates. **Soil Science,** 5: 251-290.

MEHLICH, A. 1939. Growth of Cunninghamella blakesleana as influenced by forms of nitrogen and phosphorus under varying conditions. **Soil Science,** 48: 121-133.

——— **FRED, E. B.,** and **TRUOG, E.** 1934. The Cunninghamella plaque method of measuring available phosphorus in soil. **Soil Science,** 38: 445-458.

MEHLICH, A., TRUOG, E., and **FRED, E. B.** 1933. The Aspergillus niger method of measuring available potassium in soil. **Soil Science,** 35: 259-277.

METZ, O. 1930. Uber Wachstung und Farbstoffbildung einiger Pilze unter dem Einfluss von Eisen, Zink und Kupfer. **Arch. Mikrobiol.,** 1: 197-251.

MEZZADROLI, G. 1938. The procedure for the production of citric acid by fermentation of carbohidrates. French Pat., 833.

MOLLIARD, M. 1929. Caracteres physiologiques présentés pour le Sterigmatocystis nigra en inanition de zinc et de fer. **C. R. Acad. Sci.,** Paris, 189: 417-420.

MOOERS, C. A. 1938. An evaluation of the Neubauer and the Cunninghamella and Aspergillus niger methods for the determination of the fertilizer needs of a soil. **Soil Science,** 46: 211-227.

MORGAN, M. F. 1933. Choiz de méthodes uniformes et appropriées pour la determination des besoins d'engrais de terrains. Conf. Intern. Engr. Chim., 2: 167-177.

MULDER, E. G. 1939. On the use of microorganisms in measuring a deficiency of copper, magnesium and molybdenum in soils. Antonie von Leeuwenhoek, 6: 99-109.

NELLER, J. R. 1917. A soil sampler for bacteriological and chemical purposes. **Soil Science,** 4: 109-112.

NICHOLAS, D. J. D., and **FIELDING, A. H.** 1947. The use of Aspergillus niger (M) in the bioassay of Mg, Cu, Zn and Mo in soils. **Rep. Agric. Hort. Res. Sta. Long Asthon,** 126-137.

——— 1949. The use of Aspergillus niger for the determination of Mg, Cu, Zn and Mo available in soils to crop plants: Abstracts of 'Proceeding. Ist. International Congress of Biochemistry, Combridge. Abstract No. 121/2, 302.

——— 1950. Use of the Aspergillus niger as a test organism for determining molybdenum available in soils to crop plants. **Nature,** 166: 342.

——— 1951. The use of the Aspergillus niger (M) for the determination of Mg, Zn, Cu and Mo available in soils to crop plants. **The Journal of Horticultural Science,** 26: 125-147.

NIEGHIWAKI, Y. 1924. Temperatura óptima del crecimiento y formación de diastasas del Aspergillus oryzae. **C. Bakt Bakteriologie,** 63: 102.

NIKLAS, H., POSCHENRIEDER, G. und **TRISCHLER, J.** 1930. Die Kultur des Schimmelsâuredüngebedurftigkeit der Boden. **Ernähr. Pfl.,** 26: 97-103.

PERLMAN, D. 1949. Effects of minor elements on the phisiology of fungi. **Bot. Rev.,** 15: 195-220.

PFEFFER, W. 1895. Uber Election organischer Nàhrstoffe. **Jahrb. Wiss. Bot.,** 28: 205-268.

RAULIN, J. 1869. Etudes chimiques sur la végétation. **Ann. Sci. Nat., V. Bot.,** 11: 92-299.

ROBERG, M. 1928. Uber die Wirkung von Eisen-Zinc- und Kupfersalzen auf Aspergillen. **Zbl. Bakt. I..,** 74: 333-371.

SAKAMURA, T. 1936. Uber einige für die Kultur von Aspergillen notwendigen Schwerenmetalle und das Befreiungsverfahren der Nâhrlösung von ihren Spuren. **Jour. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ. V.,** 4: 99-117.

SARTORY, A., SARTORY, R., MEYER, J. and **ARNOLD, F.** 1935. Etude preliminaire en milieux synthetiques définis des facteurs culturaux nécessaires pour déterminer la fertilité du sol au moyen du Sterigmatocystis nigra Cramer. **C. R. Acad. Sci.,** Paris, 200: 1.692-1.694.

SEIDEL, K. 1931. Eine neue mikrobiologische Methode zur Beurteilung der Nährstoffverhältnisse eines Bodens. **Archv. Pflbau,** 66: 536.

SMIT, JAN and **MULDER, E. G.** Biological estimation of Cu and Mg in soils and plants. **Rec. Trav. Chim. Pays-Bas,** 59: 623.

SMITH, A. M. 1935. Further studies on the Aspergillus niger method of examining soils. **J. Soc. Chem. Ind.,** 55: 217-221.

——— and **DRYBURGH, A.** 1934. The examination of soils by Aspergillus niger. **J. Soc. Chem. Ind.,** 53: 250-254.

STEINBERG, R. A. 1935. Nutrient solution purification for removal of heavy metals in deficiency investigations with Aspergillus niger. **J. Agr. Res.,** 51: 413-424.

——— 1936 a. Some effects of the heavy metals essential for the nutrition of Aspergillus niger upon its growth. **Amer. J. Bot.,** 23: 227-231

——— 1936 b. Relation of accessory growth substances to heavy metals including molybdenum in the nutrition of Aspergillus niger. **J. Agr. Res.,** 52: 439-448.

——— 1937. Role of Mo in utilitation of ammoniun and nitrate-nitrogen by Aspergillus niger. **J. Agr. Res.,** 55: 891-902.

——— 1938. The essentiality of Gato growth and reproduction of Aspergillus niger. **J. Agr. Res.,** 57: 569-575.

——— 1939. Growth of fungi on synthetic nutrient solution. **Bot. Rev.,** 5, 6: 327-350.

STOUT, P. R. and **ARNON, D. I.** 1939. Experimental methods for the study of the role of Cu, Mn, and Zn in the nutrition of higher plants. **Amer. J. Bot.,** 26: 144-149.

TURK, L. M. 1939. Effect of certain mineral elements on some microbiological activities in muck soils. **Soil Science,** 47: 425-445.

WALLACE, T., HEWITT, E. J. and **NICHOLAS, D. J. D.** 1945. Determination of factors injurious to plants in acid soils. **Nature,** 156: 778.

WARING, W. S. and **WERKMAN, C. H.** 1943. Growth of bacteria in an iron-free medium. **Arch. Biochem.,** 1: 303-319.

WINOGRADSKY, S. 1949. Microbiologie du sol. Problemes et methodes. Cinquante ans de recherches. Paris, Masson et Cie, editeurs. 861 pags.

WOLFF, L. K. and **EMMERIE, A.** 1930. Uber das Wachstum des Aspergillus niger und den Wupfergehalt des Nährbodens. **Biochem. Z.**, 228: 441-450.

INFORMACION

PROFESORES EXTRANJEROS EN LA SOCIEDAD DE MICROBIOLOGOS

En el pasado mes de mayo celebró la Sociedad de Microbiólogos Españoles una sesión especial, con motivo de la estancia en Madrid de los Profesores Olympio da Fonseca, Director del Instituto «Oswaldo Cruz», de Río de Janeiro; Paul Hauduroy, Director del Instituto de Higiene y Bacteriología de Lausana, y Giuseppe Penso, del Instituto Superior de Sanidad de Roma y Secretario General de la Asociación Internacional de Microbiólogos.

Primeramente, el Presidente de la Sociedad, Dr. Ruiz Falcó, dirigió un cordial saludo en nombre de la misma a los Profesores citados y propuso fueran nombrados Socios de Honor los dos primeros, ya que el Profesor Penso lo era con anterioridad, siendo aprobada dicha propuesta. A continuación fueron presentadas diversas comunicaciones científicas, con intervención de, además de los científicos extranjeros, los españoles Prof. Socías y Dr. Rubio.

Finalmente, el Prof. Penso expuso el estado de los trabajos preparatorios del próximo Congreso Internacional de Microbiología, que se proyecta celebrar el próximo año en Roma, e invitó cordialmente a asistir a dicha Reunión a los microbiólogos españoles.

CURSO EN EL INSTITUTO «FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

En este Centro se ha celebrado un curso sobre los virus durante los pasados meses de frebrero y marzo. Han tomado parte en él: el Jefe de la Sección de Virus del Instituto, Dr. don Eduardo Gallardo, y los miembros del Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal, Drs. don Miguel Rubio y don Román Vicente.

El Dr. Gallardo desarrolló cinco conferencias, con el tema «Caracteres generales de los virus y técnicas para su estudio», iniciadas el 25 de febrero y proseguidase en días alternos. El Dr. Rubio pronunció tres conferencias: «Historia, sintomatología y transmisión de los virus de las plantas», «Propiedades físicas y químicas de los virus de las plantas» e «Ideas sobre la naturaleza de los virus de las plantas», en los días 17, 18 y 21 de marzo, respectivamente.

Por último, el Dr. Vicente se ocupó de los «Virus bacterianos» los días 24 y 26 del mismo mes.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

MADRID

Acta de la sesión celebrada el día 26 de noviembre de 1951.

Bajo la presidencia de don Antonio Ruiz Falcó se abre la sesión, a las veinte horas, en un salón de los locales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas sitos en Medinaceli, 4.

Se aprueba el acta de la sesión anterior.

El señor Seoane Porrúa lee su trabajo «Optimo de latencia». El Secretario da lectura a la propuesta de ingreso como socios de don Miguel Romero Rodríguez y don Lorenzo Monzón Rivas, Farmacéuticos, de Sevilla, presentados ambos por don Miguel Martínez y don Lorenzo Vilas, siendo aprobada.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las veinte cuarenta y cinco.

Acta de la sesión celebrada el día 28 de enero de 1952.

Bajo la presidencia de don Antonio Ruiz Falcó se abre la sesión, a las veinte horas, en un salón de los locales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas sitos en Medinaceli, 4.

Aprobada el acta de la sesión anterior, el señor Vicente Jordana da lectura a una comunicación de los señores Callao y Esteban Velasco titulada «Estudios sobre la fermentación del esparto. III. La evolución del amoníaco en el proceso del enriado del esparto». A continuación, el señor Cardón lee un trabajo, hecho en colaboración con el señor Martínez, con el título «Modificación del método de Rámon para la valoración de la antitoxina diftérica».

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las veintiuna horas.

Acta de la sesión celebrada el día 18 de febrero de 1952.

Bajo la presidencia de don Antonio Ruiz Falcó se abre la sesión, a las veinte quince, en un salón de los locales del Consejo Superior de Investigaciones Científicas sitos en Medinaceli, 4.

Se aprueba el acta de la sesión anterior. El señor Santamaría lee su trabajo «Empleo de los medios sintéticos de Wickerham en los estudios sobre nutrición de los microorganismos», haciendo a continuación el señor Socías algunos comentarios sobre el trabajo.

El señor Candela expone su comunicación «Determinación del Magnesio y otros elementos en suelos, mediante el *Aspergillus niger.*». El señor Xandri, primero, y el señor Socías, después, solicitan algunas aclaraciones, que son contestadas satisfactoriamente por el señor Candela.

Y no habiendo más asuntos que tratar, se levanta la sesión a las veintiuna treinta.

BIBLIOGRAFIA

Anales de Medicina Pública, Vol. III, números 1-4. 1951. Santa Fe.

Hemos recibido últimamente el volumen III de los **Anales de Medicina Pública,** órgano de la Facultad de Higiene y Medicina Preventiva de la Universidad Nacional del Litoral de la República Argentina. Este volumen es conmemorativo del quinto aniversario de la creación de dicha Facultad, cuya dirección ostenta el Dr. Lorenzo A. García, que es asimismo organizador del Centro.

Del sumario destacaremos, por su especial interés para los microbiólogos, tres trabajos: «Problemas de la defensa contra la guerra microbiológica» y «Antibióticos. IV. Viomicina», ambos del Dr. Italo Peragallo; y «Observaciones sobre el empleo del método gasométrico en la evaluación de la actividad antibiótica de la estreptomicina sobre E. coli», del Dr. A. Padin de Olmos.

Forma parte del Cuerpo docente de la Facultad de Higiene y Medicina Preventiva nuestro compatriota el Dr. Luis E. Nájera, miembro fundador de la Sociedad de Microbiólogos Españoles y activo colaborador de esta Revista en su fase inicial. El Dr. Nájera, que ocupa las cátedras de Epidemiología y Geografía Sanitaria, colabora con seis interesantes trabajos de su especialidad en el volumen de que nos ocupamos, así como también con numerosas notas críticas de libros.

INDICE DE ARTICULOS DE REVISTAS

Bajo este epígrafe se efectúa la publicación sistemática, por orden cronológico, de los títulos de los trabajos que han aparecido en los últimos años en las principales revistas microbiológicas. En este número se recogen los títulos correspondientes a los tomos 74 y 75 (1948) de **Annales de l'Institut Pasteur** (Biblioteca del Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.—I. E.).

Mediante convenio con el Servicio de Microfilm del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, la Sociedad de Microbiólogos Españoles puede facilitar a los señores socios reproducciones de los artículos que deseen, para lo cual bastará escribir al Secretario de la Sociedad, Serrano, 113, Madrid, precisando el número en negrita que encabeza el artículo cuya copia se solicita.

Los precios y condiciones se detallan al final de esta Sección.

2.480

BARSKI (Georges).—1948. Action de la streptomycine sur l'infection tuberculeuse en cultures de tissus. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 1-11. I. E.

2.481

GRUMBACH (F.), SUREAU (B.) et BOYER (F.).—1948. La penicillinase. Conditions de production.—Etude de l'activité. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 12-18. I. E.

2.482

FAURE (M.), LAMY (R.) et COULON (M. J.).—1948. Anticorps formés chez le cheval par injection intraveineuse et intradermique d'anatoxine diphtérique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 19-26. I. E.

2.483

GALLUT (Jean).—1948. Sur le mécanisme de la réaction du choléra-roth. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 27-39. I. E.

2.484

MUTSAARS (W.) et LISON (L.).—1948. Recherches concernant l'alexine. III.—Action des esters sulfuriques polysaccharidiques. Effet antagoniste des colorants basiques. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 40-48. I. E.

2.485

JACOTOT (H.).—1948. L'addition de latex d'*Hevea brasiliensis* au vaccin antirabique formolé en vue d'augmenter son activité. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 53-54. I. E.

2.486

SOHIER (R.), BENAZET (F.) et PIECHAUD (M.).—1948. Sur un germe du genre *Listeria* apparemment non pathogène. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 54-57. I. E.

2.487

SOHIER (R.).—1948. Comportement différent des *Erysipelothrix* et des *Listeria* sur milieu de culture a l'esculine. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 57-59. I. E.

2.488

RAYNAUD et ANDRE (P.).—1948. Application de la technique de robinow a la coloration des spores bactériennes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 60-62. I. E.

2.489

CHALAUST (R.).—1948. Note sur le pouvoir ammonifiant des sables de la Camargue. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 62-66. I. E.

2.490

GRUMBACH (Françoise) et BOYER (Fernand).—1948. Méthodes de titrage de la pénicillinase. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 66-68. I. E.

2.491

MAUPIN (B).—1948. Résultats d'une enquête épidémiologique comportant plus de 300 coprocultures dans la région de l'Ouest. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 68-70. I. E.

2.492

SOLOMIDES (J.).—1948. Mise en évidence, dans le jaune d'œuf de facteurs de croissance pour certains microbes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 70-71. I. E.

2.493

SOLOMONIDES (J.).—1948. Sur la stabilisation du pouvoir bactériostatique des savons des acides gras de l'huile de foie de morue et sur leur mode d'action. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 72-75. I. E.

2.494

FAGUET (Michel).—1948. Action anti-pénicilline du nucléinate de soude et comparaison de sa vitesse d'action avec celles des anti-sulfamides et anti-pénicillines connus. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 75-79. I. E.

2.495

HAUDUROY (P.), BOUVIER (G.) et ROSSET (W.).—1948. A propos de l'article de F. Tison: Nouveau procédé d'inoculation au cobaye des produits suspects de tuberculose après modification par contact avec la pénicilline calcique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 80-81. I. E.

2.496

ALBERT BERTHELOT (1881-1947). — 1948. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 81-83. I. E.

2.497

NICOLLE (Pierre) et DUCREST (Paul).—1948. Emploi des lysats bactériophagiques obtenus en milieu nutritif pauvre, pour la préparation des sérums antiphages. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 85-90. I. E.

2.498

LUTZ (A.). — 1948. La 2-méthyl-4-amino-5-amino-méthyl-pyrimidine facteur de croissance pour les formes S et R d'une souche de bacilles paratuberculeux. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 91-98. I. E

2.499

WIRTH (John) et ATHANASIU (Pascu).—1948. Surinfection expérimentale de suspensions pures de virus vaccinal: action élective du borate de phénylmercure sur les bactéries saprophytes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 99-103. I. E.

2.500

GUELIN (A.).—1948. Etude quantitative du bactériophage de la mer. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 104-112. I. E.

2.501

VISCONTINI (Max), GAVARD (Raumond) et MILLET (Jacqueline).—1948. Action de l'acide p-aminobenzoylglutamique et des oxyméthylptérines sur Lactobacillus casei. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 113-117. I. E.

2.502

RIVIERE (Charles), SALOMON (Louis et Léone), THELY (Maurice) et GAUTRON (Gabriel).—1948. Etude des propriétés bactériostatiques de la clitocybine. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 118-123. I. E.

2.503

BERTRAND (Gabriel) et BERTRAND (Didier).—1948. Sur la présence et le dosage du rubidium dans les terres arables. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 124-127. I. E.

2.504

TISON (F.).—1948. Homogénéisation des crachats et centrifugation du bacille de Koch vivant en vue de l'inoculation au cobaye. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 128-130. I. E.

2.505

LIEOU (Y. Ch.) et KOUO (C. C.).—1948. Premier cas chinois de maladie d'Aujeszky. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 130-133. I. E.

2.506

GRABAR (Mme. J.) et LE MINOR (L.).—1948. Un cas d'infection a Salmonella, Thompson. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 133-134. I. E.

2.507

VALTIS (J.), DEINSE (F. van) et SOLOMIDES (J.).—1948. Essais de culture de BK dans le milieu de Dubos. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 134-136. I. E.

2.508

BOQUET (Paul), DELAUNAY (Albert), LEHOULT (Yvonne) et LEBRUN (Jacqueline).—1948. Action d'un antigéne typhique purifié sur le systéme circulatoire périphérique du lapin. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 136-140 I. E.

2.509

LEPINE (P.), LEVADITI (J. C.) et REINIE (L.).—1948. Durée de conservation du pouvoir antigène durvirus de la maladie de Nicolás et Favre (Lymphogranuloma venereum). **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 140-142. I. E.

2.510

SANCHEZ (G.) et LAMENSANS (A.).—1948. Dosage simple et rapide de la pénicilline et de la streptomycine dans les solutions, les émulsions, les pommades. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 142-146. I. E.

2.511

TABONE (Joseph) et ROBERT (Mlle. Daisy).—1948. Séparation des deux isomères biologiques de l'acide amino-benzoique (ortho et para) au moyen de la chromatographie sur papier. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 146-148. I. E.

2.512

MERCIER (P.), PILLET (J.) et PERY (R.).—1948. Pouvoir antigénique de la coagulase staphylococcique. I. Etude du plasma des lapins traités avec cette substance. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 148-150. I. E.

2.513

PILLET (J.), MERCIER (P.) et PERY (R.).—1948. Pouvoir antigénique de la coagulase staphylococcique. II. Etude du sérum des lapins tratés avec cette susbstance. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 150-153. I. E.

2.514

REMLINGER (P.) et BAILLY (J.).—1948. A propos du traitement antirabique après morsure de loup. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 153-154. I. E.

2.515

LEPINE (P.) et PAVILANIS (V.).—1948. Détermination par ultrafiltration de la taille du virus de la leucopénie infectieuse des chats. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 155-156. I. E.

2.516

PREVOT (A. R.).—1948. Etude des bactéries anaérobies d'Afrique Occidentale française (Sènégal, Guinée, Cote d'avoire). **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 157-170. I. E.

2.517

DEINSE (F. van) et PETROVA (Mlle. A.).—1948. Technique du maintien de la faible virulence du BGG. Etude expérimentale et critique a propos de travaux danois. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 171-174. I. E.

2.518

DEINSE (F. van).—1948. La lyse des cultures de bacilles tuberculeux sur pomme de terre a l'eau glycérinée et la lyse des bacilles tuberculeux morts en suspension aqueuse a l'abri de l'air a 38°. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 175-181. I. E.

2.519

POCHON (J.), TCHAN (Y. T.) et WANG (T. L.).—1948. Recherches sur le cycle morphologique et l'appareil nucléaire des Azotobacter. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 182-188. I. E.

2.520

GUILLAUMIE (Maylis) et KREGUER (A.).—1948. Toxine du Clostridium chauvoei. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 189-195. I. E.

2.521

POLONOVSKI (J.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Action des savons a cation actif sur les protéines. I. Précipitation de la sérumalbumine par un cation gras. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 196-202. I. E.

2.522

POLONOVSKI (J.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Action des savons a cation actif sur les protéines. II. Précipitation des protéines du sérum par un cation gras. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 203-208. I. E.

2.523

PAVILANIS (V.).—1948. Formes leucocytosiques de la leucopénie des chats. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 209-215. I. E.

2.524

GRUNBERG (M.).—1948. Action de l'oxygène sur les anaérobies stricts. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 216-232. I. E.

2.525

BERTRAND (Gabriel) et SILBERSTEIN (L.).—1948. Méthode ameliorée de recherche et de dosage de petites quantités de méthanol. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 233-241. I. E.

2.526

CHALAUST (R.).—1948. Rapports entre les microflores fixatrices et cellulolytiques. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 242-245. I. E.

2.527

ATANASIU (Pascu).—1948. Transmission de la verrue commune au singe cynocéphale (Papio papio). **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 246-248. I. E.

2.528

BERGER (Henriette) et MACHEBOEUF (Michel).—1948. Etude sur la fixation du cuivre par les hématies. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 248-251. I. E.

2.529

LIMASSET (P.) et AUGIER DE MONTGREMIER, Mlle.—1948. Application de la microséroréaction de Jermoljev et Hruska au dosage des virus des plantes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 251-252. I. E.

2.530

VELU (H.) et BOUFFANAIS (A.).—1948. Sensibilité du bacille de Schmorl a la pénicilline. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 253-254. I. E.

2.531

KOERBER (R.) et PATOCKA (F.).—1948. Recherches sur Fusocillus plauti. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 254-255. I. E.

2.532

LEBERT (F.).—1948. Etude d'une bacterie anaerobie nouvelle du fromage de gruyére fondu: Clostridium aromaticum n. sp. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 256-258. I. E.

2.533

ROBIN (L. A.).—1948. Etude de deux Spherophoraceae: Sph. pseudonecrophorus et Fusiformis nucleatus. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 258-260. I. E.

2.534

SAUTTER (V.) et LEPINE (P.).—1948. Etude des causes d'erreurs dans les réactions d'hémagglutination. Rôle du cuivre. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 261-270. I. E.

2.535

CODE DE NOMENCLATURE BACTERIENNE.—1948. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 271-299. I. E.

2.536

BARBU (Em.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Recherches sur la gélification des protéines. II.—Action de la température sur la gélification par les bases et les acides minéraux forts. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 300-311. I. E.

2.537

BARSKI (Georges) et MAURIN (Jacques).—1948. Culture sur membranes plastiques en milieu liquide de différents tissus (tissu nerveux et mésenchymateux). **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 312-322. I. E.

2.538

NISMAN (B.), RAYNAUD (M.) et COHEN (G. N.).—1948. Etude de la réaction de Stickland. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 323-327. I. E.

2.539

SOLOMIDES (J.).—1948. Influence de l'estérification sur le pouvoir bactériostatique des acides gras de l'huile de foie de morue. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 328-331. I. E.

2.540

SOLOMIDES (J.).—1948. Sur la solubilisation dans l'eau de certaines huiles et l'injection intraveineuse d'huile de foie de morue au lapin et a l'homme. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 331-332. I. E.

2.541

RAYNAUD (M.), ROBIN (L. A.) et DE LAJUDIE (P.).—1948. Etude sur Actinobacterium abcessus (Neschezadimenko) P. 1938. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 333-334. I. E.

2.542

PREVOT (A. R.) et RAYNAUD (M.).—1948. Etude cytologique des sphéroides de Spherophorus funduliformis. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 334-336. I. E.

2.543

KEPES (A.).—1948. Appareillage et technique d'enregistrement et de régulation automatique de pH et de potentiel d'oxydo-réduction dans les milieux de culture. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 337-338. I. E.

2.544

BOQUET (P.) et LEHOULT (Y.).—1948. Action du venin de Naja tripudians, de Vipera aspis et de Vipera russelli (Daboïa) sur le cytoplasme des bactéries. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 339-341. I. E.

2.545

LESSIAU (J.), CERF (R.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Etude de la biréfringence d'écoulement d'une protéine combinée a du cuivre puis débarrassée de ce métal par dialyse en présence de cyanure. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 341-344. I. E.

2.546

PEAUD LENOEL (Claude).—1948. Dosage de l'acide formique en mélange avec d'autres acides volatils. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 345-346. I. E.

2.547

GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Recherches sur le métabolisme phosphoglucidique chez une bactérie anaérobie stricte: Clostridium sporogenes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 347-367. I. E.

2.548

GROS (F.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Recherches biochimiques sur le mode d'action de la pénicilline sur une bactérie: Clostridium sporogenes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 368-387. I. E.

2.549

DEINSE (F. van), SOLOMIDES (J.) et Mlle. HARITONOFF (M.).—1948. Activité monocitogène des vieilles suspensions lysées de bacilles tuberculeux morts. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 388-393. I. E.

2.550

TCHAN (Y. T.), POCHON (J.) et PREVOT (A. R.).—1948. Etudes de systèmatique bactérienne. VIII.—Essai de classification des Cytophaga. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 394-400. I. E.

2.551

SOHIER (R.) et DEMARCHI (J.).—1948. Modification du pouvoir pathogène de la toxine diphtérique par la salive. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 401-411. I. E.

2.552

GIUNTINI (J.) et GIRARD (G.).—1948. Morphologie et dimensions de l'agent étiologique de la tularémie observè au microscope electronique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 412-416. I. E.

2.553

ATHANASIU (P.).—1948. Sur une méthode rapide d'obtention des corps élémentaires a l'état pur. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 418-420. I. E.

2.554

LEPINE (P.), CROISSANT (O.) et REINIE (L.).—1948. Structure du virus de la lymphogranulomatose inguinale examiné au microscope électronique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 421-423. I. E.

2.555

WANG (T. L.) et TCHAN (Y. T.).—1948. Recherches sur les benzoatases des Azotobacter. I.—Influence des facteurs physiques. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 423-426. I. E.

2.556

GIRARD (Henri).—1948. Préparation du silico-gel incliné en tubes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 426-429. I. E.

2.557

BUTTIAUX (R.) et KESTELOOT (A.).—1948. Sur quelques propriétés biochimiques et antigéniques des B. paracoli. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 429-432. I. E.

2.558

LWOFF (André) et IONESCO (Helène).—1948. Nécessité de l'ion Mg pour la décarboxylation oxydative de l'acide malique et la croissance de la bactérie Moraxella lwoffi. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 433-441. I. E.

2.559

LWOF (André) et IONESCO (Hélène).—1948. Le potassium et la décarboxylation bactérienne oxydative des acides malique et oxalo-acétique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 442-450. I. E.

2.560

FAGUET (Michel).—1948. Obtention d'un staphylococcus aureus résistant a la pénicilline et étude de ses caractères. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 451-457. I. E.

2.561

SCHAEFER (W.).—1948. Recherches sur la croissance du Mycobacterium tuberculosis en culture homogène. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 458-463. I. E.

2.562

ANDREJEW (A.).—1948. L'utilisation par oxydation de quelques substances azotées par le bacille de Koch. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 464-477. I. E.

2.563

KAUFFMANN (F.).—1948. A propos de la sérologie des Salmonella. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 478-484. I. E.

2.564

CUZIN (Jean) et SCHWARTZ (Daniel).—1948. Etudes d'épidémiologie statistique de la mosaique du tobac. III.—Analyse chronologique (progression de la maladie). **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 485-503. I. E.

2.565

MANOUELIAN YERBANTE (1872-1948).—1948. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 504-506. I. E.

2.566

PELLISSIER (A.) et LUMARET (R.).—1948. Sur un ultravirus isolé dans un foyer d'ictère épidémique sévissant en Oubangui. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 507-508. I. E.

2.567

PELLISSIER (A.), TRINQUIER (E.) et ARNOULT (H.).—1948. Certains singes peuvent-ils faire une encéphalite post-vaccinale? **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 508-510. I. E.

2.568

MAUZE (J.) et Mlle. PILIN (E.).—1948. La séro-agglutination de Hollande chez 61 lépreux de la Guadeloupe. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 510-512. I. E.

2.569

TISON (F.).—1948. Influence de la surinfection banale sur la tuberculose expérimentale du cobaye. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 512-514. I. E.

2.570

MOREL (Albert), JOSSERAND (André) et VIALLIER (Jean).—1948. L'alloxane a-t-elle des propriétés antiseptiques? **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 514-516. I. E.

2.571

SANDOR (G.), GIRARD (G.) et SKROBISZ (C.).—1948. Etude du sérum antipesteux de cheval. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 516-517. I. E.

2.572

SANDOR (G.), GIROUD (P.) et Mlle. SKROBISZ (C.).—1948. Etudes des anticorps anti-rickettsiae du sérum de lapin. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 518-518. I. E.

2.573

SANDOR (G.).—1948. Etudes des précipitines antiprotéidiques. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 519-520. I. E.

2.574

MARCENAC (F.).—1948. Action du tartrate d'ergotamine sur le virus herpétique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 520-521. I. E.

2.575

DELAPORTE (Mlle. Berthe) et LEMOIGNE (M. Maurice).—1948. Cas d'infection du pain par Bacillus Megatherium De Bary. **Annales de l'Institut Pasteur.** 74: 522-523. I. E.

2.576

LWOFF (André) et VALENTINI (Suzanne).—1948. Culture du flagellé opalinide Cepedea dimidiata. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 1-7. I. E.

2.577

LOCQUIN (M.) et PREVOT (A. R.).—1948. Etude de quelques antibiotiques produits par les Myxomycètes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75. 8-13. I. E.

2.578

BUSSARD (A.).—1948. Etude immunochimique de la gonadotrophine choriale humaine. I.—Essais de dissociation du précipité spécifique: gonadotrophine-antisérum de lapin. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 14-29. I. E.

2.579

OUDIN (Jacques).—1948. L'analyse immunochimique qualitative; méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 30-51. I. E.

2.580

GRUMBACH (Françoise) et BOYER (Fernand).—1948. Sur les erreurs de dosage de la streptomycine dans les milieux de culture. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 52-55. I. E.

2.581

BARBU (Emanoil), BASSET (Jacques) et MACHEBOEUF (Michel).—1948. Recherches sur la gélification des protéines. III.—Action des pressions très élevées. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 55-61. I. E.

2.582

NICOLAS KOSSOVITCH (1884-1948).—1948. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 62-64. I. E.

2.583

SZTURM (Mme. S.) et Mlle. BOURDON (D.).—1948. Bacterium alcaligenes fecalis et Hemophilus bronchisepticus. Caractères morphologiques et biochimiques. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 65-66. I. E.

2.584

HAUDUROY (Paul) et ROSSET (Willy).—1948. A propos de l'action accélératrice de la pénicillene sur la tuberculose expérimentale du cobaye. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 67-69. I. E.

2.585

HAUDUROY (Paul) et ROSSET (Willy).—1948. Action de la streptomycine sur les bacilles paratuberculeux. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 69-70. I. E.

2.586

ANDRAC (M.), GREBUS (Ch.) et GAUDE (G.).—1948. Sur un mode de notation simple et rationnel des caractères biochimiques et cultureux des principales bactéries. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 71-74. I. E.

2.587

SEIGNEURIN (R.).—1948. Cultures retardées par addition de sulfamides (suite): Leur action curative dans les infections à B. paratyphiques B de souris et des cobayes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 74-77. I. E.

2.588

PREVOT (A. R.).—1948. Culture des anaérobies en milieu non désaéré et a l'air libre en présence de réductone. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 77-78. I. E.

2.589

POCHON (J.).—1948. Recherches histopathologiques sur certaines lésions des laminaires. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 78-82. I. E.

2.590

KAUFMANN (J.), POCHON (J.) et TCHAN (Y. T.).—1948. Recherches sur la microflore oligonitrophile du sol. I.—Nutrition azotée minérale. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 83-87. I. E.

2.591

WEI (W. P.), TCHAN (Y. T.) et POCHON (J.).—1948. Essais d'interprétation de la coloration bipolaire chez quelques bactéries pathogènes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 87-89. I. E.

2.592

SOLOMIDES (J.).—1948. Recherches sur le pouvoir toberculostatique des huiles de foie de morue et de chaulmoogra iodées et solubilisées dans l'eau. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 90-92. I. E.

2.593

CHAUSSINAND (R.), PARIS (C.) et CROUGUE (O.).—1948. Essais de traitement par la streptomycine de l'infection murine due au bacille de Stefansky. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 92-94. I. E.

2.594

VATERWORTH (Pamela M.).—1948 Détection, en culture primitive de la formation de penicillinase. **Annales de l'Institut Pasteur,** 75: 94-98. I. E.

2.595

MAGROU (J.) et PREVOT (A. R.).—1948. Etudes de systématique bactérienne. IX.—Essai de classification des bactéries phytopathogènes et espèces voisines. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 99-108. I. E.

2.596

OUDIN (Jacques).—1948. L'analyse immunochimique qualitative méthode par diffusion des antigènes au sein de l'immunsérum précipitant gélosé. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 109-129. I. E.

2 597

BUSSARD (Alain).—1948. Etude immunochimique de la gonadotrophine choriale humaine. II.—Coexistence d'anticorps précipitants et non précipitants dans l'antisérum de lapin. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 130-138. I. E.

2.598

IMGRAM (M.).—1948. Fatigue musculaire, pH et prolifération bactérienne dans la viande. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 139-146. I. E.

2.599

SOBELS (Johanna C.).—1948. Contribution a l'étude physiologique de myxomycètes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 147-155. I. E.

2.600

SECKBACH (Manfred).—1948. Substances zygogènes et anazygogènes pour le cilié Glaucoma scintillans. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 156-162. I. E.

2.601

BEQUIGNON (J. R.) et VIALAT (Ch.).—1948. Les vaccinations antirabiques a l'Institut Pasteur en 1947. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 163-168. I. E.

2.602

SUREAU (Bernanrd), ARQUIE (Emile), BOYER (Fernand) et Mlle. SAVIARD (Micheline).—1948. Premières données sur la production d'une «Streptomycinase» par certaines souches microbiennes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 169-171. I. E.

2.603

MOUSSET (Mlle. M.), GRUMBACH (Mme. F.) et BOYER (F.).—1948. Sur l'accoutumance des germes a la streptomycine. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 172-177. I. E.

2.604

SUREAU (B.), BOYER (F.) et SAVIARD (Mlle. M.).—1948. Action de la pénicillinase in vivo. II.—Etude de la concentration de la pénicilline dans le sang de lapins ayant reçu de la pénicillinase. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 177-180. I. E.

2.605

BOYER (Fernand).—1948. Activité antibactérienne in vivo de l'association «sulfones-pénicilline» et «sulfones-streptomycine». **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 181-184. I. E.

2.606

BONET-MAURY (P.) et ODERBERG (G.).—1948. Préparation de sous-étalons stables pour les titrages de pénicilline. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 185-187. I. E.

2.607

ODERBERG (G.) et BONET-MAURY (P.).—1948. Etude du mode d'action de la pénicilline en présence du subtosan. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 187-188. I. E.

2.608

VELU (H.) et Mlle. CHABANAS (D.).—1948. Les erreurs de mesure de la pénicillinémie comment y remédier? **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 189-192. I. E.

2.609

LEPINE (P.) et MARCENAC (F.).—1948. Exaltation de la virulence du virus d'Aujeszky par association avec le virus herpétique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 192-194. I. E.

2.610

MOLLARET (P.), PREVOT (A. R.) et GUENIOT (M.).—1948. Premier cas humain d'une maladie ovine: hépatite nécrosante mortelle a Clostridium oedematiens. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 195-208. I. E.

2.611

ROSENTHAL (Sol Roy).—1948. Conservation du bacille de calmette et Guérin (CG) par dessiccation après congélation. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 209-216. I. E.

2.612

LEVADITI (Jean C.), PRUDHOMME (R. O.) et AUGIER (J.).—1948. Comparaison des spectres d'absorption des écrans et des espectres d'absorption et d'émission des fluorochrmes au cours de la microscopie en fluorescence. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 217-222. I. E.

2.613

AUGIER (J.) et PRUDHOMME (R. O.).—1948. Ecrans Liquides adaptes a la microscopie en fluorescence. Utilisant l'auramine comme fluorochrome. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 223-225. I. E.

2.614

BARBU (E.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Recherches sur la gélification des protéines. IV.—Action des alcools. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 226-236. I. E.

2.615

GROS (F.) et JEULIN (S.).—1948. Action des antibiotiques sur l'activité de l'auréase de soja. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 237-241. I. E.

2.616

GROS (F.), MACHEBOEUF (M.) et JEULIN (Simone).—1948. Recherches sur la mode d'action biochimique de la Streptomycine. Dans le métabolisme d'une bactérie: Clostridium sporogenes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 242-253. I. E.

2.617

ROBERT (Daisy) et MACHEBOEUF (Michel).—1948. Recherches sur les amino-acides extractibles par l'acétone puis le Méthanol. De salmonella typhymurium. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 254-258. I. E.

2.618

DE LAVERGNE (V.), HELLUY (J. R.), FAIVRE (G.) et HENRY (Ch.).—1948. Reproduction expérimentale du tétanos céphalique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 259-271. I. E.

2.619

KURTI (V.).—1948. Contribution a l'étude de l'oléolyse tuberculeuse rôle des protéines du bacille de Koch. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 272-278. I. E.

2.620

LEPINE (P.), ATANASIU (P.) et CROISSANT (O.).—1948. Aspect au microscope électronique des inclusions de la variole aviaire (crops de bollinger). **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 279-281. I. E.

2.621

LEVADITI (J. C.), LEPINE (P.), REINIE (L.) et ATANASIU (P.).—1948. Variante de la méthode de Macchiavello applicable a la microscopie en fluorescence (virus de la maladie de Nicolas et Favre). **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 281-283. I. E.

2.622

MAGROU (J.), MANIGAULT (P.) et SEVRETAIN (G.).—1948. Immunité et allergie chez les végétaux. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 283-285. I. E.

2.623

RYBAK (B.).—1948. Infections associées expérimentales du Pelargonium. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 285-290. I. E.

2.624

GOHEN-BAZIRE (G.), COHEN (G.-N.) et PREVOT (A.-R.).—1948. Nature et mode de formation des acides volatils dans les cultures de quelques bactéries anaérobies protéolytiques du groupe de clostridium sporogenes. Formation par réaction de stickland des acides isobutyrique, isovalérianique et valérianique optiquement actif. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 291-304. I. E.

2.625

SAISSAC (R.), RAYNAUD (M.) et COHEN (G. N.).—1948. Variation du type fermentaire des bactéries anaérobies du groupe de Cl. sporogenes sous l'influence du glucose. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 305-309. I. E.

2.626

NISMAN (B.) et THOUVENOT (M.).—1948. Etude du Métabolisme des acides aminés chez les bactéries anaérobies du groupe de Cl. sporogenes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 310-319. I. E.

2.627

GROS (F.), MACHEBOEUF (M.) et LACAILLE (Paulette).—1948. Action des antibiotiques sur le métabolisme protidique chez les bactéries. I.—Recherches sur le catabolisme des protéines et des peptides. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 320-328. I. E.

2.628

BARANGER (P.) et FILER (M. K.).—1948. Contribution a l'étude des mélanges d'alcaloides du quinqina. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 329-337. I. E.

2.629

PANTHIER (R.), CATEIGNE (G.) et HANNOUN (Cl.).—1948. Nouvelle technique d'étude du virus grippal premières applications pratiques. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 338-350. I. E.

2.630

RYBAK (B.).—1948. L'immunité dans le crown-gall. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 351-367. I. E.

2.631

CONGE (G.).—1948. Taches métalliques de B. pyocyaneus et bactériophages. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 368-376. I. E.

2.632

GRABAR (J.) et LE MINOR (S.).—1948. Mise en évidence de la phase spécifique chez une salmonelle en phase non-spécifique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 377-379. I. E.

2.633

BUTTIAUX (R.) et KESTELOOT (A.).—1948. Les «B. para coli» du groupe arizona leur pouvoir pathogène chez l'homme. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 379-381. I. E.

2.634

LE MINOR (L.).—1948. Une modification du milieu de peizer et steffen pour l'isolement du gonocoque. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 381-382. I. E.

2.635

LE MINOR (L.).—1948. Preparation d'un antigène pour la pratique des gonoreactions. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 383-386. I. E.

2.636

LEMOIGNE (M.) et GIRARD (H.).—1948. Courbe de distillation de l'acide alphacrotonique suivant la methode de duclaux. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 386-387. I. E.

2.637

PREVOT (A. R.).—1948. Actinomycétale anaérobie stricte nouvelle: Spherophorus ridiculosus n. sp. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 387-389. I. E.

2.638

BEEUWKES (H.) et ALADAME (N.).—1948. Sur un streptocoque anaérobie hémolytique isolé d'un cas de tuberculose spléno-pulmonaire. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 390-391. I. E.

2.639

BEERENS (H.) et ALADAME (N.).—1948. Recherches sur vibrio crassus (veillon et repaci) Prevót 1940. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 391-392. I. E.

2.640

SOLOMIDES (J.).—1948. Essai de traitement, par le distillat d'huile de foie de morue de l'impétigo expérimental du cobaye et de certaines affections cutanées. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 392-396. I. E.

2.641

DESCHIENS (R.).—1948. Les substances toxiques vermineuses; leur pouvoir pathogène, leur identification. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 397-410. I. E.

2.642

GROS (F.), MACHEBOEUF (M.) et LATTERRADE (Colette).—1948. Recherches sur le mode d'action biochimique de la tyrothricine dans les métabolismes d'une bactérie: Clostridium sporogenes. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 411-425. I. E.

2.643

BARBU (Em.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Recherches sur la gélification des protéines. V.—Considérations générales et interprétations. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 426-441. I. E

2.644

BLASS (J.), SPRINGELL (P.) et MACHEBOEUF (M.).—1948. Recherches sur les lipides du sérum sanguin existence dans le sérum de certains lipides qui n'accompagnent pas les protéines dans leur précipitation par le sulfate d'ammonium. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 442-445. I. E.

2.645

GROS (F.), MACHEBOEUF (M.) et RAMBECH (Ulf.).—1948. Action des antibiotiques sur le métabolisme protidique des bactéries. II.—Recherches sur le métabolisme des aminoacides. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 446-457. I. E.

2.646

PILLET (J.), MERCIER (P.) et PERY (R.).—1948. Recherches sur la fibrinolysine staphylococcique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 458-471. I. E.

2.647

GUELIN (A.).—1948. Lyse bactérienne par un filtrat bactériophagique sans multiplication des corpuscules. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 472-484. I. E.

2.648

GUELIN (A.).—1948. Etude des bactériophages typhiques VI dans les eaux. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 485-496. I. E.

2.649

ROSENTHAL (Sol Roy).—1948. Vaccination au moyen de l'antigène en poudre (desséché après congélation) et de la plaquette a piqures multiples. I.—Bacille de calmette et guérin (BCG). **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 497-503. I. E.

2.650

REED (C. I.), ROSENTHAL (Sol Roy) et REED (B. P.).—1948. Etude du bacille tuberculeux (BCG) au microscope électronique par la méthode des ombres portées. **Annales de l'Institut Pasteur:** 75: 504-509. I. E.

2.651

GRASSET (E.) et EDLINGER (E.).—1948. Etudes expérimentales sur le passage transplacentaire de la pénicilline par le titrage comparatif de cet antibiotique dans la circulation maternelle et foetale. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 510-521. I. E.

2.652

QUERSIN (L.).—1948. Images nucléaires au cours de divers phénomènes de lyse microbienne. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 522-531. I. E.

2.653

SANDOR (G.) et SKROBISZ (C.).—1948. Euglobulines et agglutinines. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 532-539. I. E.

2.654

LINZ (Roger).—1948. Disparition du bactériophage par culture a 45°. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 540-543. I. E.

2.655

LINZ Roger).—1948. Lyse chloroformique et antigène somatique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 544-551. I. E.

2.656

BABUDIERI (B) et ARCHETTI (I).—1948. Les leptospires aquicoles et leur constitution antigénique. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 552-563. I. E.

2.657

ETIENNE SERGENT (1878-1948).—1948. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 564-566. I. E.

2.658

BLANC (Georges) et BRUNEAU (J).—1948. De l'infection inapparente a l'infection apparente avec le virus de la pneumopathie du cobaye. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 566-569. I. E.

2.659

BLANC (Georges).—1948. Longue persistance de la virulence du bacille pesteux chez la puce du rat xenopsylla cheopis, conservée morte a sec. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 569-571. I. E.

2.660

PREVOT (A. R.).—1948. Recherches sur la réduction des sulfates et des sulfites minéraux par les bactéries anaérobies. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 571-575. I. E.

2.661

HAUDUROY (Paul).—1948. Remarques sur la note de MM. Andrac, Ch. Grebus et G. Gaude: sur un mode de notation simple et rationnel des caractères biochimiques et culturaux des principales bactéries. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 575-577. I. E.

2.662

WINOGRADSKY (Helene).—1948. Quelques observations sur la microflore autotrophe de la source sulfureuse d'uriage. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 577-582. I. E.

2.663

DIACONO (H.) et MASSA (V.).—1948. «Pseudo-agglutinines» du suc aqueux du fruit de l'olea Europea L. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 582-585. I. E.

2.664

CIACCIO (G.).—1948. Essais d'inoculation de rickettsia prowazeki et rickettsia mooseri chez les insectes. Etude des anticorps spécifiques. **Annales de l'Institut Pasteur.** 75: 585-586. I. E.

Fotocopias en microfilm.

Microfilm negativo: cada fotograma (24 × 36 mm.), 1 peseta.

Microfilm positivo (indicado cuando hay fotograbados): cada fotograma 2 pesetas.

Carpeta «Filmoteca» para diez filmofichas: 2 pesetas.

Mínimo pagable en todo encargo: el valor de una filmoficha, 5 pts. en negativo y 10 pts. en positivo.

A partir de 1.000 fotogramas, precios especiales por convenir.

Opciones que se presentan: en negativo o en positivo; en rollo continuo o en filmofichas; con carpeta «Filmoteca» o filmofichas sueltas; metiendo en cada fotograma dos páginas o sólo una.

Salvo aviso en contrario se servirán los encargos en microfilm negativo, en filmofichas y en carpetas, y el meter una o dos páginas por fotograma se supondrá se deja al discernimiento del Servicio, según sea el original.

La modalidad «filmoficha», por la gran facilidad de ordenación, archivación, localización rápida de las cintas y manejo de lectura, supera con mucho a la modalidad en rollo. Se llama «filmoficha» una tira de película de cinco fotogramas y medio (en otros sistemas seis), en que caben diez páginas de libro ordinario (libro abierto, o sea, dos páginas cada foto). El medio fotograma que se añade (uno entero en otros sistemas) se destina a «referencia», es decir, autor, título y signatura en la filmoteca y en el centro de origen. Las filmofichas, para ofrecer tales ventajas, van alojadas en unas carpetas «Filmoteca» especialmente dispuestas para contener diez de ellas (cien páginas o cincuenta folios) en lóculos perfectamente adaptados con sus referencias numéricas y espacio preciso para títulos, páginas y toda clase de indicaciones útiles.

Fotocopias en papel.

Formato:	9 × 12	cms.:	en mate,	3	ptas.;	con brillo,	3,75	ptas.
»	13 × 18	cms.:	en mate,	4	ptas.;	con brillo,	5,25	ptas.
»	18 × 24	cms.:	en mate,	6	ptas.;	con brillo,	8,25	ptas.
»	21 × 30	cms.:	en mate,	6,25	ptas.			
»	30 × 42	cms.:	en mate,	9,25	ptas.			

N. B. Estos precios están sujetos a cierta variación, según vengan facturadas las partidas de papel.

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicación del Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los «Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal». Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Bimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI».—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de «Aula Dei», Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. 1, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

ANALES DEL JARDIN BOTANICO DE MADRID.—Publicación del Instituto «Antonio J. de Cavanilles».

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Precio del tomo anual, 100 pesetas.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 30 pesetas. Suscripción, 45 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

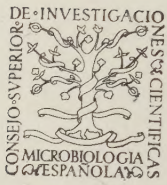
Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de Farmacognosia, tal como se concibe en el momento presente, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Instituto «José Celestino Mutis».

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan en la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.



PRECIO: 22 PESETAS